

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada

(Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos)



ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS DEL

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN

Lactococcus lactis

TESIS DOCTORAL

TOMÁS GARCÍA CAYUELA

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS



**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS DEL
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN**
Lactococcus lactis

Memoria

que para optar al grado de Doctor

presenta el Licenciado Tomás García Cayuela



Madrid, marzo de 2011

TERESA REQUENA ROLANÍA, DRA. EN VETERINARIA E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL C.S.I.C. Y CARMEN PELÁEZ MARTÍNEZ, DRA. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL C.S.I.C.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: “Estudio de la expresión de enzimas del metabolismo de aminoácidos en *Lactococcus lactis*” y de la que es autor Tomás García Cayuela, ha sido realizada en el Instituto del Frío (CSIC) y en Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM), bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid y, por tanto, autorizamos su presentación.

Y para que conste, firman el presente Certificado en Madrid a 8 de marzo de 2011

Teresa Requena Rolanía

Carmen Peláez Martínez

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi reconocimiento y agradecimiento:

A mis directoras de Tesis, las Dras. Teresa Requena y Carmen Peláez, por su orientación y ayuda durante la realización de la Tesis, así como por su apoyo y estímulo durante estos años. Agradecerles también su cálida acogida en el grupo y la confianza que depositaron en mí para desarrollar este trabajo.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por la concesión de una Beca I3P, y al Instituto del Frío (CSIC) y al Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM), por acogerme y facilitarme el trabajo durante estos años.

Al profesor Bart C. Weimer, por acogerme en sus laboratorios durante mis dos estancias en EEUU, una en la Universidad del Estado de Utah y otra en la Universidad de California-Davis, y por la prestación de recursos para los estudios con microarrays. Agradecer tanto a él como a su grupo de investigación por el excelente trato que recibí, así como por el apoyo y cariño mostrados. También quisiera agradecer a todas las personas que allí conocí y que tanto enriquecieron mi vida personal: Janneth, Prerak, Jigna, Reed, Bala, Ranjitha, Mariana, Santiago, Omar, Payton, Xiayong y Kari.

Al grupo de la Dra. Paloma López (Pilar, Mari Luz y Paloma) por su asesoría, ayuda y dedicación ante el arduo trabajo que compartimos con la construcción de los vectores.

A todos los que habéis trabajado en el grupo coincidiendo conmigo: Cristinita, Ms. Bustos (Por unas patatas al jamón...ma-to), Luz (little boxes on the hill side...), Martuki (¿nos fumamos un cigarrito?), M. Carmen y Raquel (Señores, son las 10 y 13). Gracias por vuestra ayuda en el laboratorio, por vuestra buena compañía durante esta etapa, por los ratos divertidos que hemos compartido, risas, bromas, cenas, bailes...y principalmente, por vuestro cariño y amistad. Un agradecimiento especial para Luz, mi querida compañera de “bench”, por todo el tiempo y esfuerzo compartidos durante esta etapa y por todos esos momentos vividos “codo con codo” en el laboratorio. Gracias por tus consejos, tu amistad y tu interés.

A todos los investigadores y compañeros del antiguo Departamento de Productos Lácteos del Instituto del Frío, por su carisma y amabilidad: Gloria, Lola, Javier, Luis, Manoli, Mariví, Paquita, Pilar y Toñi.

A todos los “compis” del Frío, por los buenos momentos que hemos pasado juntos, por esas comidas y cenas tan divertidas, por vuestro buen humor y sobre todo, por el cariño e interés mostrado: Ailén (y sus multirecetas con salchichas), Bea “Badajoz”, Bea “tuchef”, Belén, Carlos, Chus (no olvidaré esas comidas en el laboratorio en época de obras), Efrén, Fernando, Gonzalo-Pando (y nuestras tertulias sobre series “interesantes”), Helenita Moreno, Inés (no hay que olvidar que si el servicio “es de patada” no se deja propina), Isa (no olvidaré la “pechá” de andar que nos dimos en el bosque pintado), Javi, Lorena, Mehdi, Nuria, Óscar, Ruth (Ms. Calamar) y Tati (por esos momentos chanantes con Enjuto).

A todos los investigadores, compañeros y personal tanto del Frío como del CIAL, especialmente a Claudia, Maite y Helena Berciano. Gracias por vuestra amabilidad y apoyo.

A todos mis amigos, por todas las buenas experiencias compartidas, por animarme en esta etapa y por mostrarme su disposición en todo momento. Gracias Pepe, por estar ahí siempre, por confiar en mí y por apoyarme en todos mis retos profesionales y personales. Gracias Adrián, Ana, Aurelio, Elisa, Eva, Francisco, M. José, M. Luisa, Paco y Victoria, por vuestra amistad “coquinera”, por el cariño, interés y apoyo mostrados, y por todos esos momentos tan divertidos que hemos pasado juntos. Gracias Jaime, María y Rocío, por vuestros ánimos y por la “mescolansa” de viajes que hemos compartido. Gracias David, Laura, Rubén y Xermán, por vuestro interés y por apoyarme en esta etapa. Gracias M. Jesús por tus ánimos. Gracias Almudena y Mari, por el cariño mostrado y por haber despertado en mí el interés por la microbiología.

A toda mi familia, especialmente a mi abuela, a mis hermanos y a mis padres, por el cariño y apoyo incondicional que me han brindado siempre y por admirarme y valorarme tanto.

Y en definitiva, a todas las personas que han contribuido directa o indirectamente a la realización de esta Tesis Doctoral. Gracias.

A mis padres

“No sabe más el que más cosas sabe, sino el que sabe las que más importan”

Bernardino Rebolledo (1597-1676); militar, poeta y diplomático español.

Resumen



RESUMEN

Los aminoácidos son fundamentales para la supervivencia y el desarrollo de bacterias. Son las principales fuentes de nitrógeno y están implicados en la producción de energía, el control del pH intracelular y la regeneración de cofactores. Además, son los precursores de una larga variedad de compuestos volátiles en *Lactococcus lactis*, y por ello, diversas enzimas son consideradas clave para su formación, como aminotransferasas, deshidrogenasas, liasas y decarboxilasas, entre otras. Estas enzimas están reguladas por diferentes mecanismos en respuesta a la disponibilidad de sustratos, así como por sistemas de regulación globales que actúan a nivel transcripcional. En este sentido, los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) parecen tener un papel regulatorio clave en *L. lactis*, ya que son esenciales para la síntesis de proteínas, además de actuar de precursores de importantes compuestos volátiles. La presencia de ciertas enzimas no garantiza un determinado impacto en el aroma, por lo que se considera necesario estudiar el nivel de actuación de esas enzimas para conseguirlo, abordando estudios sobre su expresión que integren las observaciones fenotípicas con los análisis genómicos y transcriptómicos. Sólo así se podrá conocer la diversidad intra e interespecie existente en las bacterias lácticas.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la influencia de diversos mecanismos de regulación en la expresión de enzimas del metabolismo de aminoácidos y su relación en el control de la formación de compuestos volátiles en *L. lactis*.

Basados en la capacidad que presentan las estirpes naturales de *L. lactis* para crecer con bajos requerimientos nutricionales, sobre todo de aminoácidos, se estudió en *L. lactis* IFPL730 el efecto del contenido en BCAAs en el medio de crecimiento sobre la expresión de genes que están relacionados con la conversión de aminoácidos y la formación de compuestos del aroma (*araT*, *bcaT*, *kivD*, *ytjE* y *panE*) por transcripción inversa y PCR a tiempo real, y la formación de esos compuestos volátiles por SPME y GC-MS. La carencia o ausencia de BCAAs en el medio de crecimiento determinó cambios en la expresión de esos genes probablemente asociados al mecanismo de regulación mediado por el regulador global del metabolismo del nitrógeno CodY. Los

cambios genéticos en esas condiciones de crecimiento repercutieron en el perfil de compuestos volátiles detectados durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL730

Con objeto de caracterizar la respuesta en el metabolismo de aminoácidos de *L. lactis* a la carencia de isoleucina en el medio de crecimiento se realizó un estudio que abarcaba análisis genómicos y transcriptómicos. En primer lugar, el análisis genómico se realizó para investigar la organización del genoma de *L. lactis* IFPL730 mediante hibridación genómica comparativa (CGH) utilizando un microchip con los genomas de *L. lactis* IL1403 y *L. cremoris* SK11, que sirvieron para determinar diferencias en los patrones de expresión entre las estirpes. El análisis por CGH mostró la variabilidad genética existente entre tres cepas de *L. lactis*, revelando la diversidad de genes y regiones intergénicas. Además, con el análisis de la identidad de secuencia se comprobó que el genoma de *L. lactis* IFPL730 está más próximo al de *L. lactis* IL1403 que al de *L. cremoris* SK11. En segundo lugar, la respuesta a la carencia de isoleucina fue llevada a cabo mediante un estudio transcriptómico con microchips sobre dos cepas de *L. lactis* (IL1403 e IFPL730) en diferentes etapas del crecimiento. Se mostró una diversa variabilidad en la expresión de genes implicados en la hidrólisis de péptidos y el transporte de péptidos y aminoácidos en respuesta a la ausencia de isoleucina. También se estudió la expresión variable de genes involucrados en la biosíntesis de isoleucina en las dos estirpes y en diferentes estados celulares. Además, se observó la existencia de un complejo mecanismo que regulaba la carencia de isoleucina en *L. lactis*, implicando a varios reguladores y conectando el metabolismo del nitrógeno y del carbono.

La región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 posee dos presuntas secuencias consenso de promotores con polaridad divergente, una en dirección al gen *kivD* y la otra en la dirección opuesta delante de un operón compuesto por los genes *rmaF* y *rlrC*. Además, presenta una secuencia de reconocimiento para la unión con el regulador CodY (caja CodY) entre las regiones -10 y -35 del promotor P_{KivD} , además de una secuencia repetida inversa cerca de la región -35 del promotor $P_{RmaF-RlrC}$. Con objeto de caracterizar los mecanismos genéticos relacionados con la regulación de esta región promotora divergente se procedió a la fusión transcripcional de dicha región en un vector de expresión en *L. lactis*, que se construyó para la realización de este estudio

con los genes que codifican las proteínas autofluorescente roja (mRFP) y verde (GFP), organizados en sentido divergente. Los resultados obtenidos han mostrado que los reguladores RmaF y RlrC reprimen la expresión de la región promotora del gen *kivD* en un mecanismo independiente del contenido en aminoácidos y péptidos en el medio de crecimiento. Se comprobó que la expresión de la región promotora del gen *kivD* dependía de la presencia de la secuencia de la caja CodY y de la secuencia repetida inversa. Además, ambas estructuras participan en la regulación por el regulador CodY mediada por el contenido en BCAAs en el medio de crecimiento.

Índice general

A. ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo 1. Introducción general.....	1
1.1. Cultivos iniciadores.....	4
1.2. Aspectos metabólicos de la maduración del queso.....	5
1.2.1. Glicólisis.....	7
1.2.2. Lipólisis.....	7
1.2.3. Proteólisis.....	8
1.2.3.1. Sistema proteolítico de bacterias lácticas.....	8
1.3. Catabolismo de aminoácidos: rutas y actividades enzimáticas.....	12
1.3.1. Ruta catabólica iniciada por una actividad aminotransferasa: ruta de degradación de los α -cetoácidos.....	14
1.3.1.1. Actividad Aminotransferasa.....	15
1.3.1.2. Actividad Glutamato Deshidrogenasa (GDH).....	17
1.3.1.3. Actividad Hidroxiácido deshidrogenasa.....	18
1.3.1.4. Actividad cetoácido deshidrogenasa.....	19
1.3.1.5. Actividad cetoácido decarboxilasa.....	20
1.3.1.6. Actividades alcohol y aldehído deshidrogenasas.....	22
1.3.1.7. Actividad esterasa.....	22
1.3.2. Ruta catabólica iniciada por una reacción de eliminación: actividad liasa.....	23
1.3.3. Ruta catabólica no enzimática.....	25
1.4. Regulación del metabolismo de aminoácidos.....	27
1.4.1. Regulación general del metabolismo del nitrógeno por CodY.....	27
1.4.2. Regulación del sistema proteolítico.....	29
1.4.3. Regulación del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs).....	30
1.4.4. Regulación del metabolismo de aminoácidos azufrados.....	31
1.4.5. Regulación del metabolismo de otros aminoácidos.....	32
1.4.6. Diversidad en los mecanismos de regulación.....	33
1.5. Potencial de las BAL para la formación de compuestos volátiles.....	33

Capítulo 2. Objetivo y plan de trabajo..... 37

Capítulo 3. El contenido de aminoácidos de cadena ramificada en el medio de crecimiento afecta a la expresión de genes implicados en el catabolismo de aminoácidos y la formación de compuestos volátiles en *Lactococcus lactis* IFPL730..... 41

3.1. Introducción..... 43

3.2. Materiales y métodos..... 44

3.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo..... 44

3.2.2. Crecimiento celular, recuentos y pH..... 45

3.2.3. Extracción de ARN y transcripción inversa..... 46

3.2.4. Medida de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (RTi-PCR)..... 47

3.2.4.1. Diseño de cebadores y evaluación de su especificidad y eficiencia..... 47

3.2.4.2. Reacción de RTi-PCR..... 49

3.2.4.3. Análisis de los resultados obtenidos mediante RTi-PCR..... 50

3.2.5. Análisis de compuestos volátiles por SPME-GC-MS..... 51

3.2.6. Análisis estadístico..... 52

3.3. Resultados..... 52

3.3.1. Crecimientos de *L. lactis* IFPL730 en CDMs con diferente contenido en BCAAs..... 52

3.3.2. Especificidad y eficiencia de los cebadores empleados para amplificar los genes de interés en *L. lactis* IFPL730..... 54

3.3.3. Expresión relativa de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en medios de cultivo con diferente concentración de aminoácidos ramificados..... 55

3.3.4. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles producidos por *L. lactis* IFPL730 durante el crecimiento en medios de cultivo con diferente concentración de aminoácidos ramificados..... 58

3.4. Discusión..... 61

Capítulo 4. Análisis genómico y transcriptómico en <i>Lactococcus lactis</i>: respuesta en el metabolismo de aminoácidos a la carencia de isoleucina o glucosa en el medio de crecimiento.....	67
4.1. Introducción.....	69
4.2. Materiales y métodos.....	71
4.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo.....	71
4.2.2. Densidad celular, recuentos, viabilidad y determinación de glucosa.....	72
4.2.3. Extracción de ADN genómico para el estudio de hibridación genómica comparativa (CGH).....	72
4.2.4. Extracción de ARN total y transcripción inversa.....	72
4.2.5. Marcaje e hibridación del ADN o ADNc sobre el microchip.....	73
4.2.6. Normalización, visualización y análisis estadístico de datos.....	74
4.2.7. Validación del microarray y determinación de la identidad de secuencia (IS).....	74
4.3. Resultados y discusión.....	75
4.3.1. Análisis del genoma de <i>L. lactis</i> IFPL730 por hibridación genómica comparativa (CGH).....	75
4.3.2. Caracterización del crecimiento de <i>L. lactis</i> IL1403 y de <i>L. lactis</i> IFPL730 en presencia y ausencia de isoleucina en el medio de cultivo. Determinación del nivel de glucosa libre y la viabilidad de las células.....	80
4.3.3. Caracterización de la respuesta de <i>L. lactis</i> a la ausencia de isoleucina o glucosa sobre el metabolismo de aminoácidos mediante un estudio transcriptómico con microchips.....	83
4.3.3.1. Expresión de genes relacionados con la hidrólisis de péptidos y transporte de péptidos y aminoácidos.....	84
4.3.3.2. Expresión de genes en <i>L. lactis</i> relacionados con la biosíntesis de isoleucina y otros aminoácidos.....	86
4.3.3.3. Expresión de genes relacionados con los mecanismos de regulación globales.....	94
4.4. Conclusiones finales del capítulo.....	96

Capítulo 5. Estudio de la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *Lactococcus lactis* IFPL730. Empleo de vectores de fusión transcripcional con mRFP y GFP como marcadores de expresión.....99

5.1. Introducción..... 101

5.2. Materiales y métodos..... 103

5.2.1. Microorganismos, plásmidos y medios de cultivo..... 103

5.2.2. Manipulación del ADN y transformación de *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis*..... 105

5.2.3. Construcción de los vectores conteniendo los genes *mrfp* y *gfp*, que codifican para dos proteínas autofluorescentes, mRFP y GFP..... 106

5.2.3.1. Construcción del vector pAKmRFP..... 109

5.2.3.2. Construcción del vector pAKmRFP-P_X..... 109

5.2.3.3. Construcción del vector pAKmRFPGFP..... 110

5.2.3.4. Construcción de los vectores pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD} y pAKmRFPGFP-P_{KivD}-P_{RmaF-RlrC}..... 111

5.2.4. Caracterización de la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730..... 111

5.2.4.1. Verificación de la fuerza y la actividad inducible y represora de los promotores P_{RmaF-RlrC} y P_{KivD}..... 114

5.2.4.2. Evaluación del efecto de los genes reguladores *rmaF* y *rlrC* sobre la expresión de la región promotora P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}..... 114

5.2.4.3. Evaluación de la modificación de las secuencias nucleotídicas de la caja CodY y de la estructura repetida inversa presentes en la región promotora P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}..... 115

5.2.5. Determinación simultánea de la expresión de fluorescencia de mRFP o mRFP/GFP y el crecimiento celular..... 116

5.2.6. Detección de la expresión de las proteínas mRFP y GFP mediante microscopía de fluorescencia..... 117

5.3. Resultados..... 118

5.3.1. Verificación de la expresión del gen sintético que codifica para mRFP en bacterias lácticas mediante la clonación bajo el promotor P_X..... 118

5.3.2. Identificación de estirpes de *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis* que expresan simultáneamente los genes que codifican para mRFP y GFP mediante la clonación bajo la región promotora P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}..... 120

5.3.3. Detección de la expresión inducible y represora de $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y comparación de la fuerza de los promotores $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} mediante evaluación simultánea de fluorescencia procedente de GFP y mRFP en tiempo real durante el crecimiento de <i>L. lactis</i>	123
5.3.4. Efecto de los genes reguladores <i>rmaF</i> y <i>rlrC</i> sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} mediante evaluación simultánea de fluorescencia procedente de GFP y mRFP en tiempo real durante el crecimiento de <i>L. lactis</i>	126
5.3.5. Efecto de la modificación de las secuencias nucleotídicas de la caja CodY y de la estructura repetida inversa presentes en la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} sobre la expresión de GFP y mRFP en tiempo real durante el crecimiento de <i>L. lactis</i>	129
5.4. Discusión.....	131
5.4.1. Empleo de vectores de fusión transcripcional con mRFP y GFP como marcadores de expresión.....	131
5.4.2. Caracterización de la regulación de la región promotora del gen <i>kivD</i> de <i>L. lactis</i> IFPL730.....	133
5.5. Conclusiones finales del capítulo.....	137
Conclusiones.....	139
Bibliografía.....	143

B. ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1.

Tabla 1.1. Compuestos del aroma derivados de la conversión de aminoácidos..... 9

Tabla 1.2. Nombre y naturaleza química de los principales compuestos derivados del catabolismo de aminoácidos a través de la ruta iniciada por una aminotransferasa..... 14

Tabla 1.3. Especificidad de sustrato de la enzima recombinante α -cetoisovalerato decarboxilasa procedente de *L. lactis* IFPL730..... 21

Capítulo 3.

Tabla 3.1. Composición del medio químicamente definido..... 45

Tabla 3.2. Cebadores empleados..... 49

Tabla 3.3. Tasa de crecimiento máxima calculada a partir de los datos de densidad óptica a 480 nm obtenidos durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en diferentes medios de cultivo..... 53

Tabla 3.3. Recuentos en placa y medidas de pH en varias etapas del crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en diferentes medios de cultivo..... 54

Capítulo 4.

Tabla 4.1. Análisis de los genomas de *L. cremoris* SK11, *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* IFPL730 mediante hibridación genómica comparativa (CGH) por categorías funcionales..... 77

Tabla 4.2. Diferencias en expresión (LRs) encontradas en genes de la familia *ilv* en *L. lactis* IFPL730 y *L. lactis* IL1403 durante su cultivo en ausencia y presencia de isoleucina en distintas etapas del crecimiento..... 91

Capítulo 5.

Tabla 5.1. Microorganismos y plásmidos usados en este estudio..... 104

Tabla 5.2. Cebadores empleados y condiciones de PCR..... 107

C. ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1.

Figura 1.1. Transformación de los constituyentes mayoritarios de la leche en compuestos aromáticos.....	6
Figura 1.2. Esquema general de los procesos de proteólisis y transporte de péptidos y aminoácidos en bacterias lácticas.....	10
Figura 1.3. Especificidad de la hidrólisis de las peptidasas en bacterias lácticas.....	12
Figura 1.4. Esquema general de las principales rutas catabólicas que participan en la conversión de aminoácidos durante la maduración de queso.....	13
Figura 1.5. Esquema de la ruta de degradación de los α -cetoácidos.....	15
Figura 1.6. Ruta de degradación de aminoácidos azufrados por C-S liasas hasta la formación de compuestos volátiles en <i>L. lactis</i>	24
Figura 1.7. Obtención de 2-metilbutanal a partir de la conversión química de leucina.....	26

Capítulo 3.

Figura 3.1. Esquema general del catabolismo de aminoácidos en <i>L. lactis</i>	48
Figura 3.2. Curvas de crecimiento de <i>L. lactis</i> IFPL730 en diferentes medios químicamente definidos basados en el contenido en aminoácidos de cadena ramificada.....	53
Figura 3.3. Comparación de los niveles de expresión relativa de varios genes en <i>L. lactis</i> IFPL730 crecido en un medio químicamente definido con diferencias en el contenido de aminoácidos y en distintas etapas de la curva de crecimiento.....	57
Figura 3.3. Compuestos volátiles producidos por <i>L. lactis</i> IFPL730 tras 30 horas de crecimiento en diferentes medios químicamente definidos basados en el contenido en aminoácidos de cadena ramificada.....	60

Capítulo 4.

Figura. 4.1. Validación del microchip utilizado en el análisis genómico y transcriptómico empleando ADN genómico de <i>L. lactis</i> IL1403 y <i>L. cremoris</i> SK11.....	76
Figura 4.2. Representación gráfica de las intensidades (\log_2) de hibridación obtenidas para <i>L. lactis</i> IFPL730, comparándolas con las obtenidas para genes y regiones intergénicas únicos en <i>L. lactis</i> IL1403 y <i>L. cremoris</i> SK11.....	78
Figura 4.3. Representación gráfica de las intensidades (\log_2) de hibridación obtenidas en <i>L. lactis</i> IFPL730 comparándolas con las obtenidas para genes comunes en <i>L. lactis</i> IL1403 y <i>L. cremoris</i> SK11.....	79
Figura 4.4. Curvas de crecimiento y niveles de glucosa para <i>L. lactis</i> IFPL730 y <i>L. lactis</i> IL1403 en CDM y CDM-Ile.....	81

Figura 4.5. Recuentos en placa y valores de células viables y no viables de <i>L. lactis</i> IL1403 durante la incubación a 30 °C en CDM.....	82
Figura 4.6. Mapas de expresión de genes relacionados con la hidrólisis de péptidos y el transporte de péptidos y aminoácidos en <i>L. lactis</i> IFPL730 y <i>L. lactis</i> IL1403 crecidos en CDM y CDM-Ile.....	86
Figura 4.7. Ruta de biosíntesis de isoleucina interconectada con las rutas metabólicas de otros aminoácidos como ácido aspártico, treonina y metionina.....	88
Figura 4.8. Mapas de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de isoleucina en <i>L. lactis</i> IFPL730 y <i>L. lactis</i> IL1403 crecidos en CDM y CDM-Ile.....	89
Figura 4.9. Análisis por CGH del gen <i>ilvA</i> y de su región intergénica anterior a nivel de sonda.....	91
Figura 4.10. Mapas de expresión de genes relacionados con reguladores globales del metabolismo en <i>L. lactis</i> IFPL730 y <i>L. lactis</i> IL1403 crecidos en CDM y CDM-Ile.....	94
Figura 4.11. Análisis por CGH de los genes <i>codY</i> y <i>codZ</i> y de sus regiones intergénicas anteriores a nivel de sonda.....	96

Capítulo 5.

Figura 5.1. Esquema de construcción de los vectores pAKmRFP y pAKmRFPGFP y sus derivados.....	108
Figura 5.2. Regiones de ADN de <i>L. lactis</i> IFPL730 amplificadas por PCR y fusionadas al vector pAKmRFPGFP para originar los vectores derivados.....	112
Figura 5.3. Esquema de la región promotora divergente $P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}$ de <i>L. lactis</i> IFPL730.....	113
Figura 5.4. Detección de fluorescencia roja en bacterias que contienen el vector pAKmRFP- P_X	119
Figura 5.5. Detección de fluorescencia roja y verde en bacterias que contienen el vector pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}$	121
Figura 5.6. Detección de la expresión de las proteínas mRFP y GFP mediante microscopía de fluorescencia.....	122
Figura 5.7. Detección de la expresión inducible y represora de los promotores P_{KivD} y $P_{RmaF-RlrC}$	125
Figura 5.8. Detección de la expresión inducible y represora de los promotores P_{KivD} y $P_{RmaF-RlrC}$ mediante microscopía de contraste de fases.....	125
Figura 5.9. Efecto de los genes reguladores <i>rmaF</i> y <i>rlrC</i> sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}$	127
Figura 5.10. Efecto del contenido de aminoácidos y péptidos sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}$ y los genes reguladores <i>rmaF</i> y <i>rlrC</i>	128

Figura 5.11. Efecto de la modificación de las secuencias nucleotídicas de la caja CodY y de la estructura repetida inversa presentes en la región promotora $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ 130

Figura 5.12. Efecto del contenido de aminoácidos y péptidos sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ con modificaciones en la secuencia nucleotídica de la caja CodY..... 131

Capítulo 1

Introducción General

Capítulo 1

Introducción general

En los países industrializados se utilizan de forma generalizada cultivos iniciadores para la elaboración de productos fermentados. Concretamente, para la elaboración de quesos y leches fermentadas, la industria láctea utiliza cultivos de composición fija o variable que aseguran una homogeneidad aceptable en la calidad de los productos y mejoran considerablemente su seguridad.

El queso es un ecosistema complejo en cuya evolución intervienen una serie de factores externos, como las técnicas empleadas en el proceso de fabricación y las condiciones de maduración, y factores intrínsecos, como la composición fisicoquímica y las interacciones que tienen lugar entre las diferentes poblaciones de microorganismos que lo componen. Durante la maduración del queso tiene lugar el mayor número de reacciones bioquímicas e interacciones de la microbiota presente, siendo durante este proceso cuando se van a generar la mayor parte de las características deseables del producto, como son el sabor y el aroma (Peláez y Requena, 2005).

Durante las dos últimas décadas se ha generado gran cantidad de información referente a la aceleración en el desarrollo de las características organolépticas de los quesos, pudiéndose obtener productos de características sensoriales uniformes en un periodo corto de tiempo. No obstante, en la actualidad el consumidor no se conforma con productos seguros y de calidad aceptable, sino que demanda una oferta diversificada de productos que cumplan los más altos estándares de calidad organoléptica. Para conseguir esto, es necesario el diseño de tecnologías que permitan explotar al máximo el potencial de las bacterias lácticas en la formación de compuestos volátiles y en proporciones que establezcan un balance correcto para el desarrollo del aroma en queso. En este contexto, la maquinaria enzimática de bacterias lácticas implicada en el catabolismo de aminoácidos hasta la formación de potentes compuestos volátiles juega un papel fundamental.

1.1. Cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores en la industria láctea se definen como cultivos de una o varias cepas pertenecientes a una o varias especies de bacterias que se utilizan para inocular leche cruda o pasteurizada con objeto de iniciar una fermentación.

Los cultivos iniciadores constituyen en la actualidad una parte importante de una industria plenamente desarrollada y son en muchas ocasiones condición indispensable para la fabricación de gran variedad de productos lácteos fermentados. Aunque pueden estar constituidos por diferentes tipos de microorganismos, el grupo más importante está integrado casi exclusivamente por bacterias lácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Además de las bacterias lácticas, en algunas ocasiones se añaden a los fermentos para la fabricación de queso, los llamados cultivos secundarios o adjuntos, constituidos también por bacterias o por mohos y levaduras, los cuales actúan durante la maduración de los quesos produciendo compuestos que intervienen en el aspecto, aroma y *bouquet* de los mismos.

La principal función de los cultivos iniciadores es la producción de ácido láctico por fermentación de la lactosa presente en la leche, creando unas condiciones favorables para:

- Favorecer la formación de la cuajada por enzimas coagulantes.
- Estabilizar y concentrar la cuajada favoreciendo el drenaje del suero.
- Prevenir o inhibir el crecimiento de la flora patógena y alterante mediante la reducción del pH.
- Contribuir a la formación de la textura y compuestos del sabor y aroma característicos.

Además de esta función primordial de producción de ácido, los cultivos iniciadores desempeñan un papel fundamental en la maduración del queso y en el desarrollo de la textura, del aroma y del sabor, pudiendo contribuir en este último punto de dos formas: bien directamente, mediante la formación de diferentes compuestos como consecuencia de su metabolismo de carbohidratos y mediante sus sistemas proteolíticos y lipolíticos que actúan en el curso de la maduración de los

quesos, degradando las proteínas y la grasa de la leche; o bien indirectamente, regulando la presencia de otros microorganismos.

Aunque los cultivos lácticos pueden clasificarse atendiendo a múltiples aspectos tecnológicos, como velocidad de acidificación, producción de compuestos aromáticos o actividad proteolítica, la clasificación más corriente se basa fundamentalmente en dos aspectos: atendiendo a su composición y a la temperatura de crecimiento. En este sentido, los cultivos iniciadores se clasifican en cultivos de una única cepa, también conocidos como cultivos puros (sólo contienen una cepa de una especie definida), cultivos de múltiples cepas de una especie, también conocidos como cultivos múltiples (contienen más de una cepa de la misma especie) y cultivos de varias especies o cultivos mixtos (contienen cepas pertenecientes a varias especies). En función de la temperatura óptima de crecimiento, los cultivos iniciadores se componen de bacterias lácticas mesófilas o termófilas. Las bacterias lácticas mesófilas pueden crecer a temperaturas entre 18 °C y 37 °C y las termófilas entre 30 °C y 45 °C.

Los cultivos iniciadores mesófilos son los más utilizados en la industria quesera, así como en la fabricación de nata ácida, mantequilla, etc. Estos cultivos pueden contener cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis y *Leuconostoc*. Por otro lado, los cultivos termófilos se utilizan en la fabricación de quesos de pasta cocida, suizos e italianos, como Emmental, Gruyère, Parmesano, etc., en los que se alcanzan temperaturas de cocción de la cuajada muy elevadas (50-55 °C). Las especies que pueden componer los cultivos termófilos son *Streptococcus thermophilus* y diferentes especies de lactobacilos como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus* y *L. fermentum*, además de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en el caso de quesos suizos.

1.2. Aspectos metabólicos de la maduración del queso

Un queso es un sistema muy complejo donde se establecen múltiples equilibrios y se entrecruzan numerosas rutas de degradación y síntesis. Pequeñas modificaciones ambientales e intrínsecas pueden producir desplazamientos del equilibrio de las diversas reacciones implicadas, lo que constituye el fundamento

científico de algunas de las manipulaciones a las que se someten la cuajada y el propio queso en la industria alimentaria.

En el curso de la maduración se van acumulando diferentes clases de compuestos (aminas, aldehídos, cetonas, ácidos grasos libres, etc.) que contribuyen al aroma (Mülder, 1952). Estos compuestos, generalmente ausentes o en baja concentración en la cuajada, surgen como consecuencia de las transformaciones sufridas por los componentes mayoritarios de la leche (lactosa, lípidos, sobre todo los triglicéridos, y proteínas, especialmente las caseínas) (Fig. 1.1). Todas estas transformaciones están catalizadas por enzimas de diversa procedencia: unas llegan al queso directamente de la leche de cuya composición normal forman parte, algunas son añadidas en el procesado del queso, y otras son enzimas extra e intracelulares de origen microbiano.

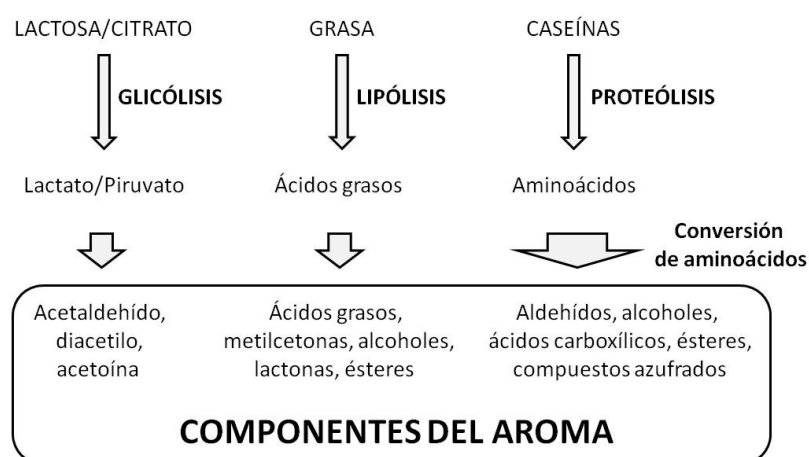


Figura 1.1. Transformación de los constituyentes mayoritarios de la leche en compuestos aromáticos. La degradación de las caseínas en aminoácidos y la posterior conversión de éstos, constituye la principal vía de formación de compuestos volátiles en la mayoría de los quesos. Adaptado de Hugenholtz y van Hylckama Vlieg (2007).

Sin negar la importancia que realmente tienen los procesos de síntesis que dan lugar a muchas de las sustancias que contribuyen al aroma, es, sin embargo, indudable que la maduración del queso comienza con fenómenos hidrolíticos, normalmente agrupados en tres categorías: (i) metabolismo de la lactosa y del citrato; (ii) hidrólisis de triglicéridos y metabolismo de los ácidos grasos; (iii) degradación de caseínas a

péptidos y a aminoácidos libres, que actúan de sustratos para reacciones catabólicas que derivan en la formación de compuestos aromáticos (Fig. 1.1).

1.2.1. Glicólisis

La acidificación de la leche y la cuajada ocurre merced a la producción de ácido láctico a partir de la lactosa por las bacterias lácticas. Esta acidificación va a acelerar la coagulación de las caseínas durante el proceso de elaboración y va a favorecer la sinéresis (expulsión del suero de la cuajada). Como producto intermediario se genera piruvato, que puede ser alternativamente convertido en varios componentes aromáticos de cadena corta como diacetilo, acetoína y acetaldehído (Smit *et al.*, 2005a).

Por otra parte, aunque la leche contiene bajos niveles y la mayoría se pierde con el suero, el citrato puede ser metabolizado (sólo por BAL capaces de transportar citrato al interior celular) y generar compuestos aromáticos como diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol (Marilley y Casey, 2004).

1.2.2. Lipólisis

La primera transformación sufrida por la grasa es la hidrólisis de triglicéridos, con liberación de ácidos grasos que se acumulan en el medio contribuyendo al aroma final, o se transforman en otras sustancias igualmente aromáticas, como metilcetonas, alcoholes secundarios, ésteres y lactonas. La contribución de las BAL a este proceso es poco relevante ya que poseen una escasa actividad lipolítica, que recae fundamentalmente sobre los triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta y sobre mono- y diglicéridos. Además, actividades lipolíticas altas son indeseables en quesos, puesto que pueden originar procesos de rancidez (Collins *et al.*, 2003). A pesar de ello, en algunos casos la microbiota secundaria, compuesta predominantemente por mohos y levaduras, es responsable de una masiva liberación de ácidos grasos y de su

transformación en compuestos altamente aromáticos, como ocurre en los quesos tipo Camembert y Roquefort (Smit *et al.*, 2005a).

1.2.3. Proteólisis

La proteólisis que ocurre durante la maduración del queso es un fenómeno de gran relevancia, ya que afecta de una forma muy acusada tanto a la textura como al sabor y aroma (Fox *et al.*, 1996). Este proceso comienza con la hidrólisis de las caseínas a cargo principalmente de la quimosina y de las proteinasas de la leche. Las BAL utilizadas como cultivos iniciadores participan principalmente en los fenómenos proteolíticos secundarios, es decir, en la degradación de los péptidos que se acumulan como resultado de la hidrólisis primaria de las caseínas (Law *et al.*, 1992). Gracias a la gran variedad de peptidasas que poseen las BAL (Fox *et al.*, 1996), estos péptidos serán transformados en aminoácidos que pueden, junto a los compuestos generados durante la glicólisis y lipólisis, participar por sí mismos en el sabor o quedar en el medio dispuestos para iniciar transformaciones catabólicas posteriores (Tabla 1.1).

Una vez que la lactosa se agota, los aminoácidos constituyen las únicas moléculas disponibles para las bacterias no lipolíticas para obtener energía (ATP), carbono, nitrógeno y azufre, produciendo a su vez compuestos con impacto en el aroma final (Urbach, 1993). Por lo tanto, la conversión de aminoácidos representa un proceso dual: constituye un mecanismo de supervivencia de las bacterias y supone a la vez el desarrollo de compuestos que influyen en el aroma y sabor del producto.

1.2.3.1. Sistema proteolítico de bacterias lácticas

En general, las bacterias lácticas son microorganismos muy dependientes en cuanto a sus requerimientos nutricionales, necesitando obligatoriamente la presencia de aminoácidos libres en el medio (Chopin, 1993). Esta auxotrofía es cepa-dependiente, variando las necesidades en el rango de 4-14 aminoácidos diferentes. La concentración de aminoácidos libres en la leche no es suficiente para el óptimo crecimiento celular de estos microorganismos. Por esta razón, las BAL poseen un complejo sistema proteolítico que implica la acción concertada de proteinasas y

peptidasas en la hidrólisis de la caseína de la leche hasta el nivel de aminoácidos esenciales necesarios para su desarrollo celular, contribuyendo a su vez en la formación de aroma (Law y Mulholland, 1995) (Tabla 1.1). El sistema proteolítico mejor estudiado entre todas las BAL es el del género *Lactococcus* (Kunji *et al.*, 1996; Siezen, 1999).

Tabla 1.1. Compuestos del aroma derivados de la conversión de aminoácidos (Requena y Peláez, 2007).

Aminoácido	Metabolito	Descripción del aroma
Leucina	3-Metilbutanal (isovaleraldehído)	Malta, queso, chocolate
	3-Metilbutanol	Malta, alcohol, queso fresco
	Ácido 3-Metilbutanoico (isovalerato)	Sudor, queso fuerte, pútrido, rancio
Isoleucina	2-Metilbutanal	Malta, queso, chocolate
	2-Metilbutanol	Malta, alcohol
	Ácido 2-metilbutanoico	Sudor, queso fuerte, pútrido
Valina	2-Metilpropanal	Malta, queso, plátano, chocolate
	2-Metilpropanol	Malta, alcohol
	Ácido 2-Metilpropanoico (isobutirato)	Sudor, rancio, ácido
Fenilalanina	Fenilacetaldehído	Floral, rosa
	Feniletanol	Floral, rosa, miel
	Ácido fenilacético	Miel
	Benzaldehído	Aceite de almendra amarga, cereza dulce
	Ácido feniletilacético	Floral, pasto
Tirosina	Ácido hidroxifenilacético	
	<i>p</i> -Cresol	Medicinal
	Fenol	Medicinal
Triptófano	Escatol (3-metil indol)	Naftalina, fecal
	Indol	Pútrido, mohoso
Metionina	Metional (3-metilpropional)	Patata cocida, azufre
	Metionol (3-metilpropionol)	Patata
	Ácido metiltiopropiónico	
	Metanotiol	Col cocida, ajo, cebolla, azufre
	Dimetildisulfuro	Col, ajo, queso maduro
	Dimetiltrisulfuro	Ajo, pútrido, col
	Dimetilsulfido	Col, ajo, azufre
Ácido aspártico	Ácido metiltioacético	
	Diacetilo (2,3-butanodiona)	Mantequilla, nuez
	Acetoína (3-hidroxi-2-butanona)	Mantequilla, leche ácida
	Ácido acético	Vinagre, agrio, ácido

Los componentes del sistema proteolítico pueden agruparse en tres categorías: (i) una proteinasa de pared celular que cataliza la formación de oligopéptidos por degradación de la caseína; (ii) sistemas específicos para el transporte de di-, tri- y

oligopéptidos a través de la membrana celular; (iii) peptidasas intracelulares responsables de la degradación última de los péptidos a aminoácidos. Un esquema del sistema proteolítico de las bacterias lácticas se representa en la figura 1.2.

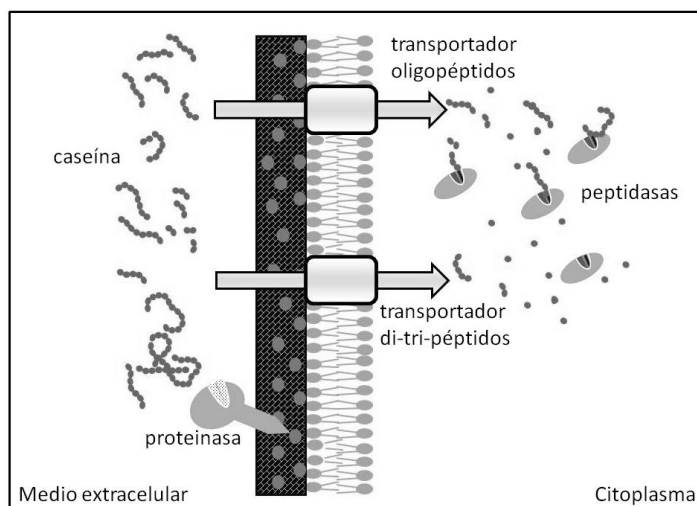


Figura 1.2. Esquema general de los procesos de proteólisis y transporte de péptidos y aminoácidos en bacterias lácticas. Adaptado de Poolman *et al.* (1995).

(i) *Proteinasa de pared celular.* La hidrólisis de las caseínas por BAL se inicia mediante una proteinasa extracelular asociada a la pared celular (Savijoki *et al.*, 2006). La proteinasa se sintetiza como una pre-pro-proteína de aproximadamente 2000 residuos aminoácidos conteniendo varios dominios funcionales (Siezen, 1999; Fernández-Esplá *et al.*, 2000). Una vez que es transportada al exterior celular a través de la membrana, la proteína permanece anclada a la misma por la zona C-terminal y se activa mediante hidrólisis de la pro-secuencia. La enzima madura es una proteína monomérica del tipo serínproteasa con una masa molecular aproximada de 200 kDa. Para el género *Lactococcus* se distinguen varios tipos de proteinasas (PrtPs) en base a los diferentes perfiles de degradación de α_{S1} -, β - y κ -caseínas, las proteinasas P_I y P_{III} (Kunji *et al.*, 1996). A su vez, las PrtPs pueden ser clasificadas en siete grupos (a, b, c, d, e, f y g) en función de la especificidad de hidrólisis frente al fragmento α_{S1} -CN (fl-23) (Kunji *et al.*, 1996). La proteinasa de pared da lugar a la formación de diferentes oligopéptidos, principalmente de entre 4-8 residuos, que contienen todos los aminoácidos esenciales para el crecimiento de estas bacterias y que son transportados al interior celular (Juillard *et al.*, 1995).

(ii) *Sistemas de transporte de di-, tri- y oligopéptidos y aminoácidos.* Para la hidrólisis última hasta aminoácidos, los productos de la hidrólisis inicial de las caseínas deben ser trasladados al interior celular a través de distintos sistemas de transporte. Los sistemas descritos hasta el momento en *Lactococcus* se pueden dividir en las siguientes categorías:

- Sistemas de transporte de aminoácidos, que exhiben una alta especificidad frente a aminoácidos estructuralmente similares. Algunos utilizan la hidrólisis del ATP como fuente de energía (Glu, Gln, Asn y Asp), otros la fuerza motriz de protones (Ala, Ser, Leu, Val, Ile y Lys), mientras que otros actúan a través de un gradiente de concentración (Arg/Orn, His/Hin, Tyr/Tyn y Asp/Ala) (Ganesan y Weimer, 2007).
- Sistema de transporte de di- y tripéptidos hidrofílicos (DtpT), que actúa bajo la fuerza motriz de protones.
- Sistema de transporte de di- y tripéptidos hidrofóbicos (Dpp), que requiere la hidrólisis de ATP.
- Sistema de transporte de oligopéptidos, que utiliza la hidrólisis del ATP y está formado por cinco tipos de proteínas: una proteína de unión a los péptidos que van a ser transportados (OppA), dos proteínas integradas en la membrana (OppB y OppC) y dos proteínas del tipo ABC -ATP Binding Cassette- (OppD y OppF) (Doeven *et al.*, 2005).

(iii) *Sistema peptidásico.* El sistema peptidásico descrito en BAL está compuesto por distintas enzimas (Fig. 1.3) cuyas características relativas a especificidad, localización celular y papel que desempeñan en la degradación última de los péptidos han sido ampliamente estudiadas (Kunji *et al.*, 1996; Law y Haandrikman, 1997; Siezen *et al.*, 2002). Dependiendo del mecanismo de acción pueden dividirse en: endopeptidasas (PepO, PepE y PepF), aminopeptidasas (PepN, PepC, PepA y PepL), carboxipeptidasas, di- y tripeptidasas (PepV y PepT) y peptidasas específicas de prolina (PepX, PepI, PepP, PepQ y PepR).

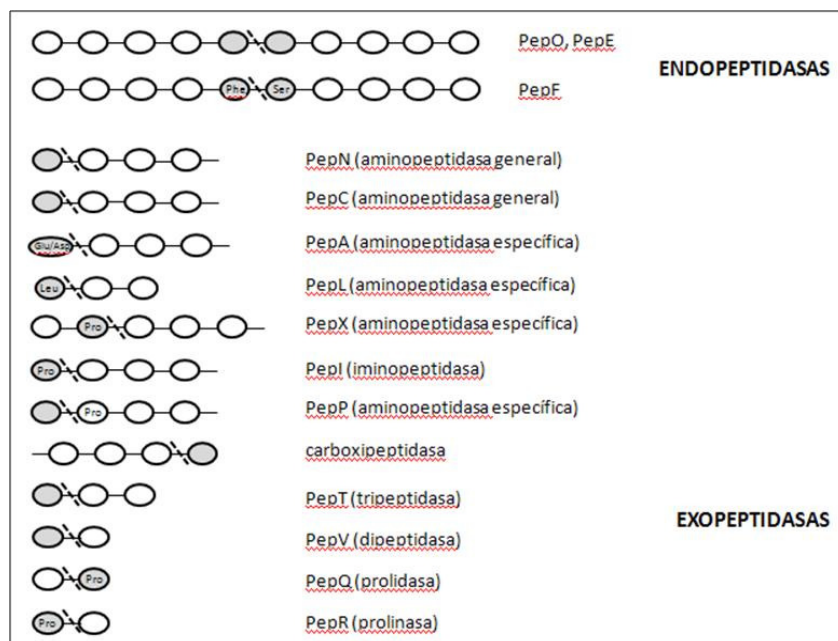


Figura 1.3. Especificidad de la hidrólisis de las peptidasas en bacterias lácticas. Adaptado de Gobetti *et al.*, 2007.

1.3. Catabolismo de aminoácidos: rutas y actividades enzimáticas

El catabolismo de los aminoácidos representa para las bacterias lácticas la generación de ATP, carbono, azufre y nitrógeno para los procesos fisiológicos. Además, se considera el principal proceso para el desarrollo de compuestos aromáticos durante la maduración de queso (McSweeney y Sousa, 2000). Los aminoácidos de cadena ramificada (Leu, Ile, Val), la metionina y los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) son los principales precursores de compuestos del aroma (Tabla 1.1), de tal forma que controlar su catabolismo supondría controlar el desarrollo del aroma en queso.

Se han descrito varios procesos de conversión de aminoácidos, incluyendo tanto mecanismos enzimáticos como no enzimáticos (Visser, 1993). De forma general, se pueden distinguir principalmente dos rutas catabólicas (Fig. 1.4). La primera de ellas es iniciada por la actividad de una enzima aminotransferasa que transfiere el grupo amino de un aminoácido a un α -cetoácido. Los α -cetoácidos producidos por la transaminación de los aminoácidos serán degradados a otros compuestos bien por reacciones químicas o bien por reacciones enzimáticas. La segunda ruta comienza con la actividad de una enzima liasa, catalizando una reacción de eliminación. Esta ruta es

particularmente importante para el catabolismo de los aminoácidos aromáticos y la metionina (Smit *et al.*, 2005a).

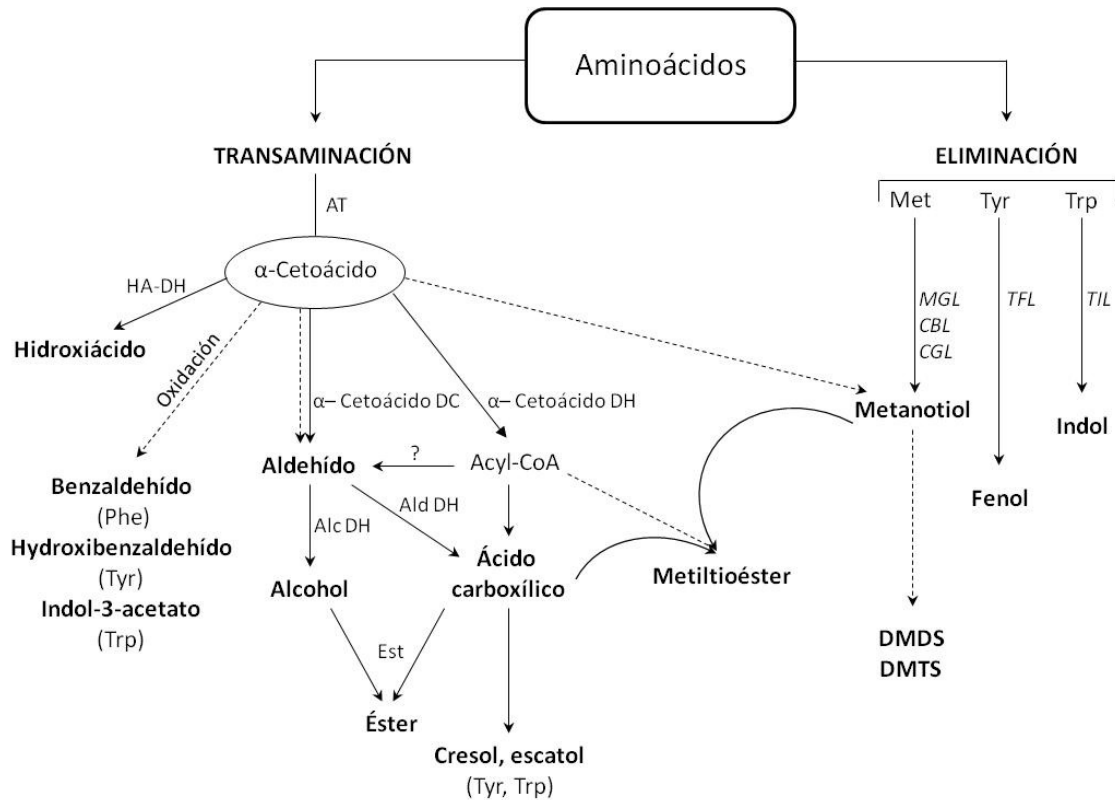


Figura 1.4. Esquema general de las principales rutas catabólicas que participan en la conversión de aminoácidos durante la maduración de queso. AT, aminotransferasa; HA-DH, hidroxilasa; α-Cetoácido DC, α-cetoácido decarboxilasa; α-Cetoácido DH, α-cetoácido deshidrogenasa; Alc DH, alcohol deshidrogenasa; AldDH, aldehído deshidrogenasa; Est, esterasa; MGL, metionina γ-liasa; CGL, cistationina γ-liasa; CBL, cistationina β-liasa; TPL, tirosina-fenol liasa; TIL, triptófano-indol liasa; DMDS, dimetildisulfuro; DMTS, dimetiltrisulfuro; línea discontinua, degradación no enzimática. Adaptado de Yvon y Rijnen, 2001.

Durante la maduración del queso se dan cita varios factores, como baja temperatura, pH ácido, alto contenido en sal y ausencia de lactosa, que hacen que las bacterias lácticas activen el catabolismo de aminoácidos, siendo el dominante en la fase final de maduración (Christensen *et al.*, 1999; Tamman *et al.*, 2000). Además, los procesos catabólicos que ocurren dependen tanto del género bacteriano y su fisiología

como de procesos metabólicos específicos (Ganesan *et al.*, 2004a y b). Es por ello que la capacidad de formación de compuestos volátiles de las bacterias lácticas sea considerado como un proceso cepa-dependiente (Seefeldt y Weimer, 2000; Yvon y Rijnen, 2001; Ganesan *et al.*, 2004a).

1.3.1. Ruta catabólica iniciada por una actividad aminotransferasa: ruta de degradación de los α -cetoácidos

Ácido isovalérico, 2-metilbutanol, 3-metilbutanal y benzaldehído son ejemplos de compuestos aromáticos generados en esta ruta, que es iniciada por una aminotransferasa, que degrada los aminoácidos a α -cetoácidos. En la tabla 1.2 se muestran los compuestos generados por esta vía a partir de los aminoácidos relevantes en la formación de aroma. En los siguientes apartados será detallada cada una de las actividades enzimáticas implicadas en esta ruta (Figura 1.5).

Tabla 1.2. Nombre y naturaleza química de los principales compuestos derivados del catabolismo de aminoácidos a través de la ruta iniciada por una aminotransferasa. Adaptado de Smit *et al.*, 2005a.

Aa	Cetoácido	Aldehído	Alcohol	Ácido carboxílico	Éster
Leu	α -Ceto-isocaproato	3-metilbutanal	3-metilbutanol	Ác. 3-metilbutírico	Etil-3-metil-butanoato
Ile	α -Ceto-3-metilpentanoato	2-metilbutanal	2-metilbutanol	Ác. 2-metilbutírico	
Val	α -Ceto-isovalerato	2-metilpropanal	2-metilpropanol	Ác. 2-metil propanoico	Etilisobutanoato
Phe	Fenilpiruvato	Fenilacetaldehído benzaldehído	Feniletanol Fenilmetanol	Ác. Fenilacético Ác. benzoico	Feniletilacetato Etilbenzoato
Tyr	Hidroxifenilpiruvato	Hidroxifenilacetaldehído	Hidroxifeniletanol	Ác. Hidroxifenilacético	p-cresol, fenol
Trp	Indole-3-piruvato	Indol-3-acetaldehído	Triptofol	Indol-3-acetato	
Met	α -Ceto-metiltiobutirato	Metional	Metiltiopropanol	Ác. metiltio-butírico	Etilmetiltio-propionato

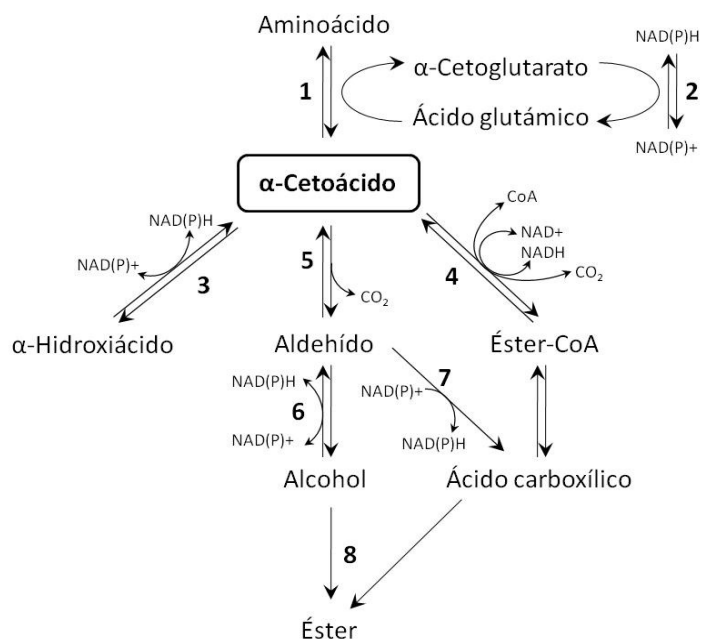


Figura 1.5. Esquema de la ruta de degradación de los α-cetoácidos. Adaptado de Liu *et al.* (2008) y Smit *et al.* (2009).

Claves numéricas:

- 1, aminotransferasa
- 2, glutamato deshidrogenasa
- 3, hidroxiaácido deshidrogenasa
- 4, α-cetoácido deshidrogenasa
- 5, α-cetoácido decarboxilasa
- 6, alcohol deshidrogenasa
- 7, aldehído deshidrogenasa
- 8, esterasa

1.3.1.1. Actividad Aminotransferasa

La transaminación de aminoácidos por bacterias lácticas es una etapa clave en su conversión hasta compuestos volátiles. En la reacción de transaminación, el aminoácido se transforma en α-cetoácido y el aceptor del grupo amino, principalmente el α-cetoglutarato, en glutámico (Yvon *et al.*, 1999). La reacción se cataliza reversiblemente por aminotransferasas dependientes de piridoxal-5-fosfato.

En el genoma de *L. lactis* IL1403 se han anotado 12 posibles aminotransferasas (Bolotin *et al.*, 2001), algunas de las cuales están aún sin caracterizar. La actividad aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada BcaT de *L. lactis* se ha caracterizado por Yvon *et al.* (2000) y la de aminoácidos aromáticos AraT por Yvon *et al.* (1997) y Gao y Steele (1998). Estas aminotransferasas presentan una cierta preferencia por determinados aminoácidos. Se ha descrito que la AraT es activa frente a aminoácidos aromáticos, principalmente fenilalanina y en mucha menor medida, leucina y metionina (Rijnen *et al.* 1999a; 2003). Por otro lado, la BcaT es activa frente a los tres aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) y en menor medida, metionina (Rijnen *et al.*, 2003). El sustrato de mayor afinidad de la BcaT es

isoleucina y se solapa con la AraT en su actividad frente a leucina y metionina. Debido al elevado número de aminotransferasas en *L. lactis* (Bolotin *et al.*, 2001) y a la capacidad que tienen de utilizar varios sustratos resulta algo complejo asignar un sustrato específico a cada una de ellas.

El papel individual de las aminotransferasas de *L. lactis* en el catabolismo de aminoácidos sólo se conoce parcialmente. Se han llevado a cabo mutaciones en los genes que codifican las enzimas para estudiar el impacto de determinadas aminotransferasas sobre la conversión de aminoácidos. La inactivación de ambos genes, *araT* y *bcaT*, tanto separadamente como en conjunto (Rijnen *et al.*, 1999b; Yvon *et al.*, 2000; Rijnen *et al.*, 2003), ha permitido demostrar la importancia de estas aminotransferasas en la producción de compuestos aromáticos en sistemas modelos de queso. Además se pudo demostrar con esos trabajos que tanto AraT como BcaT son esenciales para la formación de compuestos volátiles derivados de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada (“branched chain amino acids”, BCAAs) y que participan de manera importante en la formación de compuestos volátiles azufrados.

La reacción de transaminación es posible gracias a la presencia de un aceptor de grupos amino. El α -cetoglutarato es el α -cetoácido aceptor con el que tienen más afinidad las aminotransferasas, aunque hay otros α -cetoácidos que también pueden ser utilizados como aceptores (Weimer, 2007), como son piruvato y oxalacetato; sin embargo, en estos dos últimos casos las actividades aminotransferasas son menores que con el α -cetoglutarato (Yvon *et al.*, 1997; Yvon *et al.*, 2000). Además de ser el sustrato con mayor afinidad, se ha demostrado que el α -cetoglutarato es el factor limitante de la actuación de las aminotransferasas. Ensayos realizados en pastas de quesos han demostrado que al añadir exógenamente α -cetoglutarato, se observa un aumento significativo de la cantidad de compuestos aromáticos producto del catabolismo de los aminoácidos (Yvon *et al.*, 1998; Banks *et al.*, 2001). Similares resultados han sido obtenidos utilizando BAL con actividad glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima que produce α -cetoglutarato por desaminación oxidativa del glutamato (Kieronczyk *et al.*, 2003). Igualmente se ha demostrado que las aminotransferasas compiten por el α -cetoglutarato, de ahí que la producción de compuestos volátiles se vea afectada por las actividades relativas que tengan sobre determinados aminoácidos

(Kieronczyk *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha descrito que el α -cetoglutarato puede autodegradarse hasta ácidos grasos (Ganesan *et al.*, 2004a), lo que limitaría aun más la reacción de transaminación.

Los α -cetoácidos producidos en la reacción de transaminación se transforman posteriormente por vía química y/o enzimática en compuestos derivados, algunos de los cuales son volátiles. La formación de los α -cetoácidos es, por tanto, un factor limitante en la generación de estos compuestos volátiles y juega un papel clave en el control de la formación de aroma. Este hecho ha quedado demostrado en estudios de sobreexpresión de enzimas catabólicas como α -cetoácido decarboxilasa, que no han conducido al aumento de compuestos volátiles debido a la limitación de la presencia del cetoácido (Smit *et al.*, 2005b), o en estudios de inducción de lisis bacteriana que han indicado el papel clave de la transaminación en las reacciones de catabolismo de aminoácidos (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006a).

1.3.1.2. Actividad Glutamato Deshidrogenasa (GDH)

Como se ha mencionado, la reacción de transaminación de aminoácidos en BAL requiere obligatoriamente la presencia de un aceptor de grupos amino que es preferentemente el α -cetoglutarato. En *L. lactis*, este compuesto puede producirse por tres rutas metabólicas, vía actividad glutamato deshidrogenasa (GDH), que lo forma a partir de ácido glutámico, y por otras dos rutas que requieren citrato permeasa y citrato liasa (Tanous *et al.*, 2005a).

La clasificación habitual de estas enzimas se realiza en función de sus especificidades metabólicas, distinguiéndose dos clases, las dependientes de NAD^+ y aquellas dependientes de NADP^+ . La actividad GDH- NAD^+ específica se relaciona con un papel fundamentalmente catabólico, mientras que la dependencia de NADP^+ supone una implicación de la enzima en la síntesis de ácido glutámico y por tanto se relaciona con una función básicamente anabólica (Smith *et al.*, 1975).

A través de un estudio de comparación de genomas se ha observado la presencia del gen *gdh* en *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y

Streptococcus thermophilus (Liu *et al.*, 2008). Asimismo se ha descrito la actividad GDH en estirpes silvestres de bacterias lácticas tanto de origen vegetal como lácteo (Tanous *et al.*, 2002; Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta los estudios de Tanous *et al.* (2002), no se había detectado la presencia del gen *gdh* (está ausente en el genoma de *L. lactis* IL1403) en estirpes de *L. lactis* empleadas en la producción de queso, sugiriendo la posibilidad de que el gen sólo exista en algunas cepas de la especie.

El gen que codifica la actividad GDH en *L. lactis* NCD01867 fue caracterizado por Tanous *et al.* (2005b), observándose que la actividad en esta estirpe silvestre se encontraba en un plásmido (pGdh442) formando parte del transposón Tn3. El análisis de la secuencia del plásmido pGdh442 ha revelado que se trata de un plásmido de gran tamaño que puede ser transmitido de forma natural vía movilización conjugativa, aunque podría no ser compatible con otros plásmidos de lactococos (Tanous *et al.*, 2007). Adicionalmente se ha clonado y comparado funcionalmente el gen *gdh* de *L. lactis*, *L. plantarum* y *S. thermophilus* (De la Plaza *et al.*, 2005).

A pesar de los numerosos trabajos centrados en la conversión de aminoácidos y su relación en la formación de aromas en quesos, todavía sigue siendo desconocida la prevalencia de la enzima GDH en cepas silvestres de *L. lactis*.

1.3.1.3. Actividad Hidroxiácido deshidrogenasa

La reducción de los α -cetoácidos producidos por transaminación da lugar a hidroxiácidos (Roudot-Algaron e Yvon, 1998). La reacción se cataliza a través de hidroxiácido deshidrogenasas (HA-DHs) dependientes de NAD(H), denominadas genéricamente hidroxiisocaproato deshidrogenasas, ya que el α -cetoisocaproato es su sustrato preferente.

Esta actividad ha sido observada en bacterias lácticas, tanto en lactococos (Gao *et al.*, 1998; Roudot-Algaron e Yvon, 1998) como en lactobacilos (Schütte *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 1985; Bernard *et al.*, 1994; Yvon *et al.*, 1998; Gummalla y Broadbent, 1999). En particular, se ha demostrado que *L. lactis* produce α -hidroxiácidos a partir de

los α -cetoácidos derivados de los aminoácidos no sólo *in vitro* sino también en queso (Yvon *et al.*, 1998; Yvon y Rijnen, 2001).

El análisis de los genomas de *L. lactis* IL1403 y MG1363 (Bolotin *et al.*, 2001; Wegmann *et al.*, 2007) mostraron que *L. lactis* poseía varias HA-DHs, presentando homología con otras HA-DHs de otras bacterias lácticas. Sin embargo, se demostró experimentalmente que ninguna de estas presuntas enzimas tenía actividad HA-DH (Chambellon *et al.*, 2009). De hecho, esta actividad fue identificada, mediante mutagénesis aleatoria, en el producto codificado por el gen *panE*, que había recibido dicha anotación por su homología con ketopantoato reductasas. Además, se comprobó que la enzima codificada por *panE* era la única responsable de la reducción de los α -cetoácidos de cadena ramificada a α -hidroxiácidos en *L. lactis* (Chambellon *et al.*, 2009).

Los productos generados en esta reacción, los hidroxiácidos, no son compuestos aromáticos ni precursores del aroma, por lo que la reducción de los α -cetoácidos a estos compuestos implica una disminución de los α -cetoácidos disponibles y, por consiguiente, una menor producción de compuestos aromáticos (Yvon y Rijnen, 2001; Chambellon *et al.*, 2009).

1.3.1.4. Actividad cetoácido deshidrogenasa

La decarboxilación oxidativa de los α -cetoácidos resultantes de la transaminación da lugar a ácidos carboxílicos sin formación transitoria de aldehído. Se ha propuesto que esta conversión está catalizada por el llamado complejo cetoácido deshidrogenasa, compuesto por tres componentes: α -cetoácido deshidrogenasa, dihidrolipoiltransacilasa y lipoamida deshidrogenasa (Yvon y Rijnen, 2001). Este complejo no se ha caracterizado en bacterias lácticas todavía, pero se conoce que actúa fundamentalmente a pH 5,5 y se inhibe por arsénico trivalente. Dicha actividad se ha observado en *L. lactis* (Gao *et al.*, 1997; Yvon *et al.*, 1998) y en propionibacterias (Thierry *et al.*, 2002). Los ácidos carboxílicos derivados de BCAAs como el isovalérico o de aminoácidos aromáticos como el indolacético o el hidroxifenilacético, son volátiles

potentes que además pueden actuar como precursores de otros compuestos volátiles como ésteres, tioésteres o tioles.

1.3.1.5. Actividad cetoácido decarboxilasa

La decarboxilación no oxidativa de α -cetoácidos genera aldehídos, de los cuales los de cadena ramificada (2-metilpropanal y 2- y 3-metilbutanal) han acaparado gran parte de la atención en los últimos años por intervenir de forma importante en el desarrollo del aroma de algunos quesos (Barbieri *et al.*, 1994). Estos aldehídos aportan un aroma asociado a malta o chocolate y tienen bajos umbrales de detección, siendo de 0,10, 0,13 y 0,06 mg/L para 2-metilpropanal y 2- y 3-metilbutanal, respectivamente (Sheldon *et al.*, 1971). Debido además a que en concentraciones muy elevadas estos aldehídos pueden conferir sabores anormales en algunos tipos de queso como Cheddar o Gouda (Ayad *et al.*, 2000; 2003), su correcta formación juega un papel fundamental en el balance del aroma final (Morales *et al.*, 2003).

La actividad cetoácido decarboxilasa es frecuente en plantas, levaduras y hongos, pero es poco habitual en bacterias (Candy y Duggleby, 1998; Iding *et al.*, 1998; Köning, 1998) y ha sido descrita sólo en algunas especies de bacterias lácticas (Hickey *et al.*, 1983; Smit *et al.*, 2004b; Helinck *et al.*, 2004; De la Plaza *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008), encontrándose que en *L. lactis* se relaciona en mayor medida con cepas que no tienen un origen lácteo (Tucker y Morgan, 1967; Smit *et al.*, 2004a). La enzima α -cetoácido decarboxilasa (codificada por el gen *kivD* o *kdcA*) fue purificada y caracterizada por primera vez en *L. lactis* por De la Plaza *et al.* (2004) y posteriormente por Smit *et al.* (2005b). De los genomas de *L. lactis* publicados en la actualidad (Bolotin *et al.*, 2001; Makarova *et al.*, 2006; Wegmann *et al.*, 2007; Siezen *et al.*, 2010) se puede observar la presencia del gen *kivD* en *L. lactis* KF147 y en *L. lactis* IL1403, aunque en este último el gen es idéntico en un 74% al anotado como *ipd* (que presuntamente codifica para una indolpiruvato decarboxilasa), el cual está interrumpido por la inserción de un elemento IS983, responsable de la pérdida de actividad de la enzima.

El estudio de De la Plaza *et al.* (2004) mostró que el gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 presenta un total de 1647 pares de bases y codifica para una proteína de 61 kDa. Con el análisis de la secuencia de aminoácidos deducida se comprobó que se trataba de una enzima α -cetoácido decarboxilasa no oxidativa, dependiente de tiamina difosfato, incluida dentro del grupo de enzimas piruvato decarboxilasas. Mostró una actividad óptima a 45°C y a pH 6,5 y en presencia de Mg^{2+} como cofactor, si bien la actividad también fue observada en presencia de otros cationes como Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Na^{+} . La enzima manifestó una alta especificidad frente a α -cetooisovalerato, metabolito intermedio de la síntesis de leucina y valina, aunque también se detectó actividad sobre otros sustratos (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Especificidad de sustrato de la enzima recombinante α -cetooisovalerato decarboxilasa (a una concentración de $1 \mu g mL^{-1}$) procedente de *L. lactis* IFPL730. Adaptado de De la Plaza *et al.*, 2004.

Sustrato	Actividad específica (U mg^{-1})	Actividad relativa (%) ^a
α -Cetooisovalerato	$80,7 \pm 5,7$	$100 \pm 7,1$
α -Cetooisocaproato	$18,3 \pm 3,1$	$22,7 \pm 3,9$
α -Cetometilvalerato	$13,5 \pm 1,3$	$16,7 \pm 1,6$
α -Fenilpiruvato	$7,1 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,4$
α -Cetometiltiobutirato	$5,8 \pm 1,2$	$7,2 \pm 1,5$
Piruvato ^b	$0,46 \pm 0,0$	$0,6 \pm 0,0$
Indol-3-piruvato ^b	$0,07 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$

^a Porcentaje de actividad frente a la máxima del α -cetooisovalerato.

^b Reacción con $100 \mu g mL^{-1}$ de enzima recombinante.

La enzima denominada α -cetooisovalerato decarboxilasa (KivD, por su máxima especificidad frente al α -cetooisovalerato) es considerada como clave para la formación de aldehídos procedentes de aminoácidos de cadena ramificada (De la Plaza *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2005b; Yvon, 2006; De la Plaza *et al.*, 2009). Esta actividad enzimática también interviene en la decarboxilación de α -cetometiltiobutirato procedente de la transaminación de metionina dando lugar a metional (Amárta *et al.*, 2001). Los aldehídos formados por la actividad KivD pueden reducirse (vía alcohol deshidrogenasa) u oxidarse (vía aldehído deshidrogenasa) a los correspondientes ácidos orgánicos. Dado que estos ácidos también pueden formarse directamente a través del complejo cetoácido deshidrogenasa, es probable que las bacterias utilicen

preferentemente esta vía que economiza energía, de ahí que no se haya encontrado actividad α -cetoácido decarboxilasa en bacterias lácticas de forma generalizada (Smit *et al.*, 2005a; Fernández de Palencia *et al.*, 2006).

1.3.1.6. Actividades alcohol y aldehído deshidrogenasas

Los aldehídos producidos tras la decarboxilación no oxidativa de los α -cetoácidos podrían reducirse a alcoholes a través de la actividad alcohol deshidrogenasa (AlcDH) o en cambio, sufrir una oxidación que generaría ácidos carboxílicos a través de la actividad aldehído deshidrogenasa (AldDH).

Estas actividades han sido poco estudiadas en bacterias lácticas. A pesar de ello, un estudio de comparación de genomas de varias bacterias lácticas evidencia la presencia en *L. lactis* de varias enzimas con actividad AlcDH y una bifuncional con actividad AldDH/AlcDH (Liu *et al.*, 2008).

1.3.1.7. Actividad esterasa

La reacción entre ácidos carboxílicos y alcoholes da lugar a la formación de ésteres, tales como etilbutirato y etilisovalerato, que suelen ser los responsables del aroma frutal de ciertos quesos (Fox y Wallace, 1997).

El gen *estA*, que codifica una esterasa que cataliza la biosíntesis de ésteres derivados de ácidos grasos de cadena corta fue clonado y caracterizado en *L. lactis* por Fernández *et al.* (2000), mostrando que la actividad esterasa quedaba anulada al mutar el gen. Otro estudio con cepas de *L. lactis* mutantes en actividad esterasa confirmó que *estA* codifica la única enzima responsable de la síntesis de ácidos grasos de cadena corta *in vitro* (Nardi *et al.*, 2002). A pesar de ello, la extrapolación de esos resultados al queso es realmente difícil, teniendo en cuenta que el equilibrio de la reacción de esterificación depende de diversos factores, como la actividad de agua (Smit *et al.*, 2005a).

1.3.2. Ruta catabólica iniciada por una reacción de eliminación: actividad liasa

Las enzimas liasas catalizan una reacción de eliminación, utilizando como sustratos frecuentes los aminoácidos azufrados y en menor medida los aromáticos. Las actividades tirosina-fenol liasa y triptófano-indol liasa, responsables de la β -eliminación de tirosina y triptófano (produciendo fenol e indol, respectivamente) (Fig. 1.4), han sido detectadas en levaduras, micrococos y *Brevibacterium linens*, no así en BAL (Parliment *et al.*, 1982; Jollivet *et al.*, 1992; Gummala y Broadbent, 1999). La falta de evidencia de esta actividad sobre los aminoácidos aromáticos en *L. lactis* hace suponer que en lactococos la conversión de estos aminoácidos se realice por la ruta iniciada por una aminotransferasa (Gao *et al.*, 1997).

Metanotiol (MTL) y otros compuestos volátiles azufrados como dimetilsulfuro (DMS), dimetildisulfuro (DMDS) y dimetiltrisulfuro (DMTS), con gran impacto en el perfil sensorial de quesos (Weimer *et al.*, 1999), derivan normalmente de metionina y cisteína a través de la actividad liasa. La figura 1.6 muestra un esquema de esta actividad sobre los aminoácidos azufrados, acompañada de otras reacciones químicas o enzimáticas asociadas. Otro compuesto de interés, el sulfuro de hidrógeno (H_2S), puede originarse tras la acción de una C-S liasa o una cisteína sintasa (CysK) a partir de cisteína u homocisteína (Liu *et al.*, 2008).

La actividad liasa constituye la principal vía de degradación de metionina en microorganismos utilizados en la producción de queso (Yvon y Rijnen, 2001). La metionina es conducida a la formación de MTL, α -cetobutirato y amonio gracias a la acción de C-S liasas: metionina γ -liasa (MGL), cistationina β -liasa (CBL) y cistationina γ -liasa (CGL) (Liu *et al.*, 2008). La actividad MGL fue observada principalmente en *B. linens* (Ferchichi *et al.*, 1985), y la enzima fue posteriormente purificada y caracterizada (Dias y Weimer, 1998a). Además, una mutación del gen *mgl* redujo considerablemente la capacidad de esta cepa para producir compuestos volátiles azufrados (Amárita *et al.*, 2004). Sin embargo, ninguno de los genomas de bacterias lácticas estudiados parece tener el gen *mgl* (Liu *et al.*, 2008).

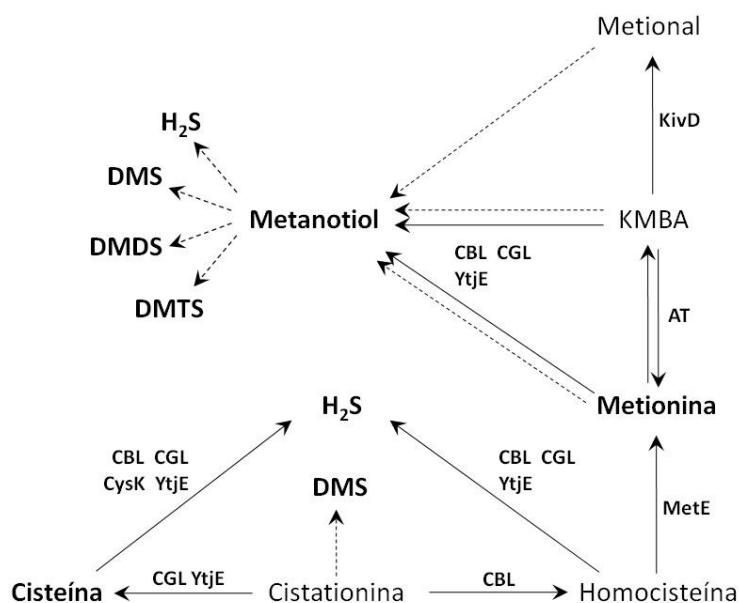


Figura 1.6. Ruta de degradación de aminoácidos azufrados por C-S liasas hasta la formación de compuestos volátiles en *L. lactis*. En esta ruta también aparecen otras enzimas (MetE, metionina sintasa; AT, aminotransferasa; KivD, α -cetoisovalerato decarboxilasa) o degradaciones químicas (línea discontinua). Las C-S liasas que participan son: CBL, cistationina α,β -liasa; CGL, cistationina α,γ -liasa; YtjE, cistationina α,γ -liasa; CysK, cisteína sintasa. Adaptado de Liu *et al.* (2008).

En *L. lactis*, cuya capacidad para producir compuestos volátiles azufrados es limitada frente a la de lactobacilos y brevibacterias (Dias y Weimer, 1998b), la actividad está catalizada por cistationina liasas, CBL y CGL, catalizando una α,β -eliminación y una α,γ -eliminación, respectivamente, convirtiendo cistationina a homocisteína o cisteína (Fig. 1.6). Además, se ha observado que otros compuestos azufrados pueden sufrir una α,γ -eliminación, como por ejemplo, la metionina para formar MTL, aunque en este caso la actividad enzimática fue de 10 a 100 veces más baja que a través de cistationina (Weimer *et al.*, 1999; Yvon y Rijnen, 2001). CBL ha sido purificada en varias BAL, y el gen que codifica la enzima en *L. lactis* (*metC*) fue identificado (Alting *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 2000b). La actividad enzimática de CGL ha sido detectada en *L. lactis* SK11 (Bruinenberg *et al.*, 1997), mientras que el gen *cgl* de *L. lactis* MG1363 fue caracterizado experimentalmente (Dobric *et al.*, 2000). El análisis de especificidad de sustrato de las enzimas sugiere una función solapada entre CBL y CGL. Por ejemplo, se ha observado que la CBL es capaz de catalizar una α,γ -eliminación en *L. lactis* B78 y MG1363 al igual que lo haría la CGL (Alting *et al.*, 1995; Dobric *et al.*, 2000).

La inactivación de los genes que codifican para las aminotransferasas AraT y BcaT (con cierta actividad sobre metionina) en *L. lactis* no limitó la producción de compuestos volátiles azufrados, sugiriendo la presencia de otra ruta de degradación (Rijnen *et al.*, 2003). No obstante, no se ha descrito ninguna aminotransferasa específica para la metionina en lactococos. Del genoma de *L. lactis* IL1403 se propuso como aminotransferasa específica de metionina el producto codificado por el gen *ytjE* (Bolotin *et al.*, 2001). Sin embargo, al estudiar el metabolismo del azufre y su regulación en *L. lactis*, se pudo observar que YtjE participaba en la conversión de cistationina a homocisteína (Sperandio *et al.*, 2005).

En nuestro laboratorio se caracterizó la enzima YtjE, y para tal fin, el gen *ytjE* de *L. lactis* IL1403 fue clonado en *E. coli* y sobreexpresado y purificado como una proteína recombinante (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006b). Sin manifestar actividad aminotransferasa específica de metionina, YtjE mostró actividad C-S liasa, compartiendo homología con la familia de enzimas MaY/PatC implicadas en la degradación de L-cisteína, L-cistina y L-cistationina. Igualmente, se observó una actividad α,γ -liasa sobre L-metionina. Además, con GC-MS se comprobó que la actividad YtjE condujo a la formación de H₂S a través de cisteína, y de metanotiol y sus productos derivados, DMDS y DMTS, a través de metionina (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006b). Por tanto, YtjE compartiría con otras liasas (CBL y CGL) la propiedad de degradar aminoácidos azufrados para producir compuestos aromáticos de interés.

1.3.3. Ruta catabólica no enzimática

Aunque la mayoría de las reacciones de transformación de los aminoácidos y α -cetoácidos en los diferentes compuestos aromáticos son enzimáticas, también se ha observado la existencia de reacciones químicas de degradación de estos compuestos en condiciones de maduración de queso (Figs. 1.4 y 1.6). Los α -cetoácidos derivados de la fenilalanina (fenilpiruvato) y de la metionina (α -cetometiltiobutirato), son degradados químicamente a benzaldehído (Gao *et al.*, 1997; Yvon *et al.*, 1998) y metiltioacetaldéhído (Bonnarme *et al.*, 2004), respectivamente. La degradación espontánea de hidroxifenilpiruvato a hidroxibenzaldehído también fue observada

cuando se simularon condiciones de queso (Kieronczyk *et al.*, 2004), y cantidades significativas tanto de benzaldehído e hidroxifenilbenzaldehído se han encontrado en quesos semicurados (Yvon *et al.*, 1998).

La conversión química de α -cetoácidos, especialmente el α -cetoisocaproato (derivado de la leucina), puede ocurrir en condiciones de maduración de queso (Smit *et al.*, 2009). La figura 1.7 muestra como el aldehído 2-metilpropanal puede ser formado a partir de una conversión enzimática derivada de la valina y a partir de una conversión no enzimática procedente de la leucina. La conversión química se basa en una oxidación dependiente de la disponibilidad de sustrato (α -cetoácido y oxígeno), de manganeso y del pH (Smit *et al.*, 2004c; Kieronczyk *et al.*, 2006).

Otra degradación química observada es la llamada degradación de Strecker, que ocurre sobre la leucina produciendo 3-metilbutanal (Smit *et al.*, 2009). El grupo amino de la leucina reacciona con el grupo dicarbonilo de un azúcar reductor, produciéndose una deaminación, seguida de una decarboxilación y derivando en la formación del aldehído (Rizzi *et al.*, 1998).

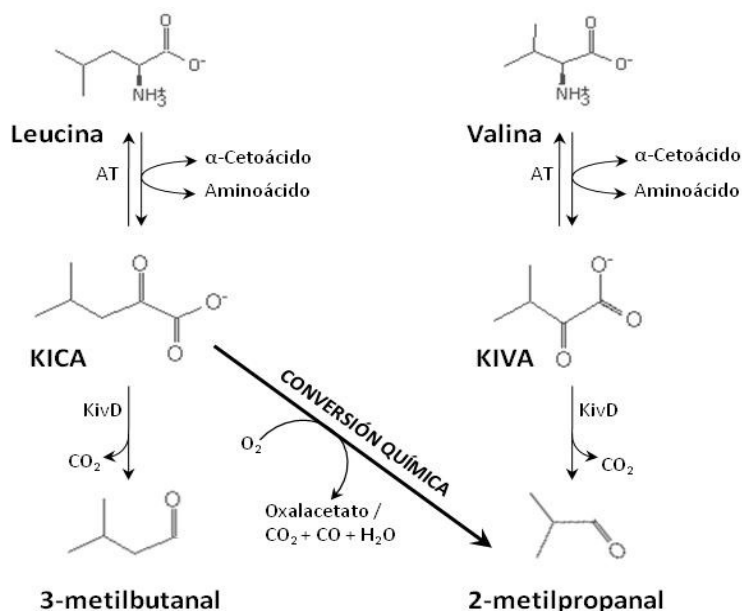


Figura 1.7. Obtención de 2-metilbutanal a partir de la conversión química de leucina. KICA, α -cetoisocaproato; KIVA, α -cetoisovalerato. Adaptado de Smit *et al.* (2005a).

1.4. Regulación del metabolismo de aminoácidos

El metabolismo de aminoácidos en BAL está regulado por diferentes mecanismos específicos que incluyen tanto el control bioquímico de las enzimas como de su expresión en respuesta a la disponibilidad de sustratos, así como por sistemas de regulación globales que actúan a nivel transcripcional (Guédon *et al.*, 2005). Las enzimas que participan en la conversión de aminoácidos pueden estar implicadas en la biosíntesis de los mismos y no sólo en sus rutas catabólicas. La biosíntesis de aminoácidos está altamente regulada, y por lo tanto, las condiciones de crecimiento de los cultivos iniciadores podrían afectar también a su capacidad de formación de compuestos volátiles (Smit *et al.*, 2005a). Por ejemplo, en *L. lactis*, el gen que codifica para una cistationina β -liasa (*cbl* o *metC*) se transcribe junto al gen *cysK*, que codifica para una cisteína sintasa (Fernández *et al.*, 2000), uniendo así las rutas biosintéticas de la metionina y la cisteína (Met/Cys). La expresión del grupo *metC-cysK* está influenciada por la cantidad de Met/Cys en el medio de crecimiento (Fernández *et al.*, 2002), por lo que altas concentraciones de estos aminoácidos reducirían la transcripción y la actividad β -liasa se vería afectada, comprometiendo la formación de compuestos volátiles azufrados (Smit *et al.*, 2005a).

En general, las bacterias controlan el uso de los nutrientes mediante reguladores globales de la transcripción, tales como CcpA y CodY, vinculando la expresión de genes al cúmulo intracelular de determinados metabolitos (Sonenshein, 2007). Además de esos reguladores existen otra serie de factores que actúan a nivel de operón o gen, afectando a enzimas implicadas tanto en la biosíntesis como en la degradación de aminoácidos (Guédon *et al.*, 2001; Smit *et al.*, 2005a; Liu *et al.*, 2008).

1.4.1. Regulación general del metabolismo del nitrógeno por CodY

CodY es un regulador transcripcional que se encuentra en muchas especies de bacterias Gram-positivas con bajo contenido en G+C, aunque la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en *B. subtilis* y *L. lactis*. Este regulador controla la mayoría de genes implicados en la asimilación de péptidos, incluyendo su transporte y

su posterior degradación por peptidasas (Guédon *et al.*, 2001a), además de controlar la expresión de algunos transportadores de aminoácidos. CodY, por tanto, actúa sobre la mayoría de genes encargados del suministro de aminoácidos desde el exterior. Asimismo, reprime la expresión *de novo* de la mayoría de los genes implicados en la rutas de biosíntesis de aminoácidos, tales como BCAAs, glutamato-glutamina, histidina, serina, treonina, lisina y asparagina.

De todas ellas, la ruta de biosíntesis de BCAAs es la más controlada por CodY tanto en *L. lactis* (Guédon *et al.*, 2005) como en *B. subtilis* (Molle *et al.*, 2003). Los BCAAs son los efectores intracelulares que activan la represión por CodY en *L. lactis* (Guedon *et al.*, 2001a; Petranovic *et al.*, 2004) y en *B. subtilis* (Shivers y Sonenshein, 2004; Sonenshein, 2007), por ello, en ambas especies, CodY ejerce un control *feedback* sobre la ruta de biosíntesis de sus efectores directos. Se ha observado que la isoleucina (Ile) es el efector más importante de entre todos los BCAAs para activar a CodY (Shivers y Sonenshein, 2004; Guedon *et al.*, 2005; den Hengst *et al.*, 2005a). Un exceso de isoleucina provocaría una inhibición del crecimiento, en tanto que se bloquearían las rutas de biosíntesis de aminoácidos en dependencia de la unión CodY-Ile. Esto se ha observado en varios estudios con medios químicamente definidos (“chemically defined media”, CDMs) en *L. lactis* donde se reprime la biosíntesis de valina y leucina (Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997), asparagina, histidina, lisina y treonina (Guedon *et al.*, 2005). Asimismo, esta inhibición del crecimiento también ha sido observada en medios complejos como leche (Chambellon e Yvon, 2003).

Existen numerosos estudios en *L. lactis* que tratan la regulación mediada por CodY. Guedon *et al.* (2005) identificó mediante microarrays de ADN cerca de 100 genes expresados por *L. lactis* IL1403 regulados por CodY, de los que el 45% codifican enzimas relacionadas con las rutas de biosíntesis de aminoácidos y prácticamente el resto de genes están relacionados con el suministro de nitrógeno. En otro estudio con microarrays se comparó el perfil de expresión de *L. lactis* MG1363 con la misma cepa pero con el gen *codY* mutado (Den Hengst *et al.*, 2005b). Las células fueron crecidas en un medio rico en péptidos y en la etapa exponencial del crecimiento, donde CodY ejerce una mayor represión, la expresión de cerca de 30 genes aumentó significativamente en la estirpe mutante. Los genes que incrementaron su expresión

principalmente estaban implicados en el metabolismo y transporte de aminoácidos, aunque también se alteró la expresión de algunos genes del ciclo de Krebs, por lo que CodY también podría estar implicado en la regulación del metabolismo del carbono, tal y como se ha detallado en *B. subtilis* (Molle *et al.*, 2003; Sonenshein, 2007).

Los genes que son potencialmente regulables por CodY van a presentar en posición -35 de la región promotora una secuencia palindrómica de 15 nucleótidos (AATTTTCNGAAAATT) que actúa como una región de alta afinidad para CodY (Guedon *et al.*, 2005; Den Hengst *et al.*, 2005b). Se ha demostrado que la presencia de la denominada caja CodY es suficiente para provocar una regulación mediada por CodY *in vivo*. Además, se ha identificado esta secuencia palindrómica en la región promotora del propio gen *codY*. Por lo tanto, CodY regula su propia síntesis y requiere de una caja CodY y BCAAs para interactuar con su promotor (Den Hengst *et al.*, 2005b).

1.4.2. Regulación del sistema proteolítico

Ante carencias en la disponibilidad del nitrógeno, las BAL regulan la actividad del sistema proteolítico para asegurarse un apropiado balance nitrogenado en la célula (Savojoki *et al.*, 2006). En primer lugar, se sugirió que ciertos residuos hidrofóbicos y di/tripéptidos actuaban como moléculas efectoras para regular la transcripción del sistema de transporte de oligopéptidos Opp en *L. lactis* (Kunji *et al.*, 1996; Detmers *et al.*, 1998). Posteriormente se observó que la expresión de varios genes del grupo de peptidasas Pep fue reprimida por la adición de un hidrolizado de caseína y que la expresión se restauró sólo cuando las células eran expuestas a condiciones limitantes de nitrógeno (Guédon *et al.*, 2001c). De forma similar y mediante técnicas de proteómica se comprobó que la expresión de ciertas proteínas del sistema proteolítico (Opp, PepO1, PepN, PepC, PepF y OptS) era inducida cuando *L. lactis* era crecido en un medio carente de algunos aminoácidos y péptidos (Gitton *et al.*, 2005). En la actualidad se conoce que en un medio rico en nitrógeno el sistema proteolítico queda reprimido por CodY y que la expresión se reestablece cuando las células se encuentran en condiciones limitantes de BCAAs (Guédon *et al.*, 2005; Den Hengst *et al.*, 2005b).

Asimismo se han detallado mecanismos regulatorios independientes de CodY, como los observados para las peptidasas PepF (Gitton *et al.*, 2005), PepO1 y PepC, cuya expresión fue inducible por aireación incluso cuando el gen *codY* estaba mutado (Vido *et al.*, 2004). Además, la fuente de carbono afectó a la expresión de *pepP* en *L. lactis* (Guédon *et al.*, 2001c), sugiriendo una regulación a través de CcpA. No obstante, dos reguladores más se han descrito para controlar la actividad proteolítica de lactococos, como CtsR y TrmA que regula a proteasas del grupo Clp (Frees *et al.*, 2001; Varmanen *et al.*, 2000).

1.4.3. Regulación del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs)

L. lactis utiliza a los BCAAs como señales moleculares directas para activar al represor CodY, asegurándose a su vez, el propio suministro de estos aminoácidos, para los que la mayoría de lactococos son auxotróficos (Godon *et al.*, 1993). Además, los BCAAs presentan funciones muy importantes dentro de la célula, como participar en la síntesis de ácidos grasos y determinar la hidrofobicidad proteica. El papel clave de los BCAAs en la regulación mediada por CodY se refleja en el hecho que el operón *ilv* (implicado en la biosíntesis de BCAAs) es uno de los más reprimidos, especialmente cuando la isoleucina interviene en la regulación (Godon *et al.*, 1992; Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997; 2000; Den Hengst *et al.*, 2005a).

La expresión de enzimas que participan en el catabolismo de los BCAAs también se ha visto afectada por la actividad de CodY. Por ejemplo, los genes *bcaT* y *araT* en *L. lactis* NCDO763 fueron reprimidos en CDM suplementado con casitona, observándose que el principal efector de CodY era el contenido en isoleucina y no el de valina o leucina (Chambellon e Yvon, 2003). Esta misma observación se obtuvo para el gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 (De la Plaza *et al.*, 2009). En ese trabajo se sugiere que el papel del α -cetoisovalerato (KIV) como metabolito intermedio en la biosíntesis de valina y leucina podría influir en la ausencia del efecto represor de CodY mediado por esos aminoácidos en la expresión de *kivD*. Además, y en concordancia con lo descrito para la α -acetolactato decarboxilasa de *L. lactis* (Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997), la deficiencia de leucina o valina indicaría a la célula que el flujo metabólico controlado por KivD

debería ser dirigido desde KIV hasta la síntesis de leucina y valina y no hacia la ruta catabólica (De la Plaza *et al.*, 2009).

1.4.4. Regulación del metabolismo de aminoácidos azufrados

Existe una gran diversidad en relación a la regulación genética de las enzimas implicadas en el metabolismo de la metionina y la cisteína (Met/Cys) en BAL y otras bacterias Gram-positivas (Liu *et al.*, 2008). De hecho, se pueden encontrar numerosos estudios que abordan la regulación de la conversión de Met/Cys, como los realizados en *Bacillus subtilis* (Hullo *et al.*, 2007), en *Streptococcus mutans* (Sperandio *et al.*, 2007) o en *L. lactis* (Sperandio *et al.*, 2005).

Esta regulación contempla no sólo a reguladores que actúan a nivel transcripcional, como CmbR y MetR/MtaR, sino también a sistemas de regulación a nivel de ARN (*riboswitches*). Dos tipos de *riboswitches* han sido descritos en procariotas, T-box y S-box (Epshtein *et al.*, 2003). Un *riboswitch* es una región del ARNm que puede modificar su conformación ante un estímulo molecular y por tanto, permitir o no la transcripción (Tucker y Breaker, 2005). Se ha observado que la biosíntesis de metionina, así como la de homocisteína y cistationina están reguladas principalmente por una T-box en *L. plantarum* y *Leuconostoc* (Rodionov *et al.*, 2004; Wels *et al.*, 2008;), al igual que el gen *cysE* (que codifica para una acetiltransferasa de serina) en *B. subtilis* (Pelchat y Lapointe, 1999). El sistema de regulación por una S-box actúa por mediación de S-adenosilmetionina (SAM) y ha sido observada sobre todo en géneros como *Bacillus* y *Clostridium* (Auger *et al.*, 2002; Rodionov *et al.*, 2004;), aunque en especies de *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* se ha identificado una S_{MK}-box que regula el gen de la SAM sintetasa (Fuchs *et al.*, 2006).

Por otro lado, los reguladores MetR/MtaR y CmbR pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales de LysR (LTTRs). Se ha confirmado que MetR presenta un 81% de homología con MtaR y ambos se unen a secuencias palindrómicas, denominadas MET-box, en *S. mutans* (Sperandio *et al.*, 2007). Además, se han identificado secuencias MET-box en la región anterior de varios genes en

estreptococos y del operón *metEF* en estreptococos y *L. lactis* (Rodionov *et al.*, 2004; Kovaleva y Gelfant, 2007). En *L. lactis*, la mayoría de los genes que catalizan las enzimas del metabolismo de Met/Cys están regulados por CmbR como es el caso de *cysD*, *cysM*, *metB2*, *cysK*, *metA*, *metB1*, *ytjE*, entre otros (Sperandio *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la unión de CmbR a los promotores de estos genes en *L. lactis* está estimulada por bajas concentraciones de Met/Cys y por *O*-acetil-L-serina (Fernández *et al.*, 2002; Golic *et al.*, 2005; Sperandio *et al.*, 2005), por lo que la enzima CysE, implicada en la síntesis de OAS, controlaría la actuación de CmbR.

1.4.5. Regulación del metabolismo de otros aminoácidos

En la regulación del metabolismo de la arginina pueden actuar factores transcripcionales específicos y globales (Guédon *et al.*, 2001b). Por ejemplo, se han identificado dos factores transcripcionales homólogos, ArgR y AhrC, en *L. lactis*, implicados tanto en la represión de la biosíntesis de arginina como también en la activación de su ruta catabólica (Larsen *et al.*, 2004). Además, se ha sugerido la implicación del regulador del metabolismo del carbono CcpA en la regulación de esas rutas (Kunji *et al.*, 1993; Gaudu *et al.*, 2003;), conectando el metabolismo de la arginina con la respuesta al estrés generada por la ausencia de azúcar (Chou *et al.*, 2001).

EL regulador GlnR está implicado en la regulación de la enzima glutamina sintetasa (GS), responsable de la asimilación de iones amonio para producir glutamina, un donador de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, bases y vitaminas (Reitzer, 1996). El gen *glnA* (que codifica para GS) se sitúa posterior al gen *glnR* formando el operón *glnRA*. En *L. lactis*, el regulador GlnR reprime la transcripción del operón *glnRA* en respuesta al contenido extracelular de glutamina y amonio (Larsen *et al.*, 2006).

Aunque *L. lactis* requiere del sistema proteolítico para un crecimiento óptimo en leche, también es capaz de sintetizar la mayoría de aminoácidos cuando se crece en un medio químicamente definido (CDM) al que le pueden faltar determinados aminoácidos (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995). En base a ello, se caracterizó la regulación de la transcripción de algunos genes y operones implicados en la biosíntesis

de aminoácidos, como la del triptófano, donde la expresión del operón *trp* aumentó en 3-4 veces cuando algún aminoácido faltaba en el CDM (Raya *et al.*, 1998). Asimismo, la transcripción del operón *his* (implicado en la biosíntesis de histidina) fue reprimido en presencia de histidina, sugiriendo la presencia de un represor (Delorme *et al.*, 1999).

1.4.6. Diversidad en los mecanismos de regulación

A pesar de la extensa caracterización de *L. lactis* a lo largo de las últimas décadas, muy pocos estudios han revelado la diversidad en los mecanismos de regulación en *L. lactis*. Recientemente, Marreddy *et al.* (2010) ha mostrado las diferencias de expresión de ciertas proteínas del catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* crecido en medios sintéticos y complejos. Por otro lado, Bachmann *et al.* (2009) ha observado que la regulación por CodY de diversas enzimas (PepN, HicDH, BcaT y esterasa) difiere claramente entre cepas de origen lácteo y no lácteo. Aunque cierta variación era lo esperado, el nivel de diversidad fue muy alto, apoyando la idea de que es necesario demostrar experimentalmente la expresión de enzimas codificadas por genes identificados a través de anotaciones de genomas. No obstante, esa identificación se puede enfrentar a problemas debidos a incorrecciones en las anotaciones del genoma (De la Plaza *et al.*, 2004; Martínez-Cuesta *et al.*, 2006; Chambellon *et al.*, 2009). En otros casos, estos genes podrían no encontrarse formando parte de operones que faciliten su estudio, o puede ocurrir que su expresión sea poco frecuente como consecuencia de mutaciones sufridas por adaptación a condiciones de crecimiento. Por todo ello, es imprescindible conocer extensamente las capacidades enzimáticas de cada cepa para su aplicación industrial.

1.5. Potencial de las BAL para la formación de compuestos volátiles

Dentro del extenso grupo de BAL existe una gran diversidad en relación a la capacidad de formación de compuestos volátiles, tanto entre estirpes relacionadas

como en distintas cepas de una misma especie (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007). Esta diversidad puede estar causada por tres mecanismos:

- El primero es que los genes que codifican las enzimas clave para la formación de compuestos volátiles sólo son expresados por una fracción de las especies. Por ejemplo, el 3-metilbutanal, un compuesto del aroma encontrado en quesos es producido por unas pocas cepas de *L. lactis* que contienen una particular enzima decarboxilasa (De la Plaza *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2004b; Smit *et al.*, 2005b).
- El segundo mecanismo depende de la existencia de diferentes variantes de una enzima en una especie. Pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos de esas enzimas puede resultar en una actividad catalítica alterada. Por ejemplo, la cistationina β -liasa de dos cepas de *L. lactis* con un 94,3% de homología mostraron una diferencia de hasta 4 veces en la producción de compuestos volátiles a partir de metionina (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007).
- El tercero radica en el hecho que la mayoría de las enzimas implicadas en la producción de volátiles está sujeta a una fuerte regulación genética (Kok *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2000). Por ejemplo, la expresión de las enzimas del sistema proteolítico en *L. lactis* está fuertemente regulado por el regulador global del nitrógeno CodY y el contenido en BCAAs en el medio (Den Hengst *et al.*, 2005b). De esta manera, es asumible que el patrón de regulación pueda ser diferente entre cepas, aunque esto todavía no ha sido muy estudiado.

La diversidad en la capacidad de formación de volátiles también ha sido observada al comparar cepas silvestres con cepas de laboratorio. Se comprobó que las cepas silvestres presentaban una mayor capacidad para sintetizar aminoácidos (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995). La mayoría de las cepas de *L. lactis* usadas en las fermentaciones industriales requieren de glutamato, valina, metionina, histidina, serina, leucina e isoleucina para crecer, siendo el número de aminoácidos esenciales dependiente de cada cepa (Ayad, 2008). Sin embargo, las cepas salvajes requieren solo de unos cuantos

aminoácidos para crecer. La ausencia de algunas rutas biosintéticas de aminoácidos en las cepas industriales puede ser consecuencia de su adaptación a los productos lácteos, en tanto que en la leche se encuentran la mayoría de aminoácidos disponibles a través de las caseínas. Las cepas silvestres, en contra, no están asociadas a ambientes ricos como la leche, lo que los hace más dependientes de su propia biosíntesis. Una mayor capacidad de biosíntesis de aminoácidos se ha relacionado con una mayor actividad enzimática y por tanto, con una mayor capacidad de producción de compuestos volátiles (Mauriello *et al.*, 2001; Tavaría *et al.*, 2002). En algunos casos, los aromas producidos se definen como achocolatados, afrutados o “cheese farm like” y se deben a la producción de aldehídos y alcoholes derivados de BCAAs que pueden conferir olores anormales al queso (Morales *et al.*, 2003). No obstante, estos compuestos forman parte de la fracción volátil de quesos como el Parmesano y contribuyen positivamente a su aroma si se encuentran en un balance adecuado (Barbieri *et al.*, 1994).

La presencia de ciertas enzimas no garantiza un determinado impacto en el aroma, por lo que se considera necesario estudiar el nivel de actuación de esas enzimas para conseguirlo, abordando estudios sobre su expresión que integren las observaciones fenotípicas con los análisis genómicos y transcriptómicos. Sólo así se podrá conocer la diversidad intraespecie existente en BAL y con ello, el potencial de formación de volátiles de cada cepa, siendo de gran utilidad para la selección de cepas potencialmente útiles en la industria como productoras de compuestos volátiles en alimentos fermentados como el queso (Smit *et al.*, 2005a; Liu *et al.*, 2008; Tan-a-ram *et al.*, 2011).

Capítulo 2

Objetivo y Plan de Trabajo

Capítulo 2.

Objetivo y plan de trabajo

Lactococcus lactis se caracteriza por disponer de diferentes actividades enzimáticas que actúan durante la producción de queso y que afectan a las propiedades organolépticas, tanto en relación a la textura como en el desarrollo del aroma y sabor. En concreto, el catabolismo de aminoácidos resulta clave para la formación de compuestos volátiles, existiendo varias rutas catabólicas y en donde pueden participar diferentes clases de enzimas como aminotransferasas, decarboxilasas, liasas, deshidrogenasas, entre otras. Estas enzimas están reguladas por diferentes mecanismos específicos que incluyen tanto el control bioquímico de las enzimas como de su expresión en respuesta a la disponibilidad de sustratos, así como por sistemas de regulación globales que actúan a nivel transcripcional.

Tanto en ambientes naturales como en medios complejos industriales, las bacterias lácticas pueden enfrentarse a una carencia de aminoácidos, y para afrontar dicha carencia tienen que reajustar sus rutas metabólicas. En este sentido, los aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) parecen tener un papel regulatorio clave en *L. lactis*, ya que son esenciales para la síntesis de proteínas, además de actuar de precursores de compuestos volátiles. Específicamente, el contenido de isoleucina, asociado al regulador global CodY, participa en la regulación de genes y operones relacionados con la biosíntesis, transporte y catabolismo de aminoácidos. A pesar de la extensa caracterización de *L. lactis* a lo largo de las últimas décadas, muy pocos estudios han revelado la diversidad en los mecanismos de regulación de enzimas en *L. lactis*.

El presente trabajo se planteó como una excelente oportunidad para abordar el estudio sobre la expresión de las enzimas que participan en las rutas de síntesis y degradación de aminoácidos, integrando observaciones fenotípicas con análisis genómicos y transcriptómicos en estirpes de *L. lactis* sometidas a condiciones de crecimiento con diferencias en la disponibilidad de BCAAs, dado su marcado carácter regulador.

Por ello, el objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la influencia de diversos mecanismos de regulación en la expresión de enzimas del metabolismo de aminoácidos y su relación en el control de la formación de compuestos volátiles en *L. lactis*. Para la consecución de este objetivo se ha llevado a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Determinar la influencia de los BCAAs en el medio de crecimiento sobre el nivel de expresión de enzimas implicadas en el catabolismo de aminoácidos y formación de compuestos volátiles en *L. lactis*.
2. Caracterizar la respuesta en el metabolismo de aminoácidos de *L. lactis* a la carencia de isoleucina en el medio de crecimiento mediante un estudio genómico-transcriptómico.
3. Caracterizar los mecanismos genéticos relacionados con la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730.

Capítulo 3

El Contenido de Aminoácidos de Cadena Ramificada en el Medio de Crecimiento Afecta a la Expresión de Genes Implicados en el Catabolismo de Aminoácidos y la Formación de Compuestos Volátiles en *Lactococcus lactis* IFPL730

Capítulo 3

El contenido de aminoácidos de cadena ramificada en el medio de crecimiento afecta a la expresión de genes implicados en el catabolismo de aminoácidos y la formación de compuestos volátiles en *Lactococcus lactis* IFPL730

3.1. INTRODUCCIÓN

Lactococcus lactis se caracteriza por disponer de diferentes actividades enzimáticas que actúan durante la producción de queso y que afectan a las propiedades organolépticas, tanto en relación a la textura como en el desarrollo del aroma y sabor (Kunji *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 2005a). Los aminoácidos son los precursores de una larga variedad de compuestos volátiles, y por ello, diversas enzimas son consideradas clave para su formación, como aminotransferasas, deshidrogenasas, liasas y decarboxilasas, entre otras (Ganesan y Weimer, 2007).

La expresión de las enzimas convertidoras de aminoácidos puede verse afectada por diferentes mecanismos de regulación (Smit *et al.*, 2005a). Un ejemplo de ello lo constituye el regulador transcripcional CodY, que activa o reprime genes que participan en el metabolismo del nitrógeno, en respuesta al cúmulo de péptidos o aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en el medio de crecimiento (Guédon *et al.*, 2001b; Guédon *et al.*, 2005; Den Hengst *et al.*, 2005b). Asimismo, las condiciones ambientales también pueden determinar diferencias en la expresión, como sucede ante cambios drásticos en el pH, en la osmolaridad, en la actividad de agua e incluso ante la falta de nutrientes (Dressaire *et al.*, 2008). En este sentido, las estirpes de *L. lactis* aisladas de nichos naturales presentan con frecuencia una mayor capacidad de adaptación a la carencia de aminoácidos frente a las cepas de uso industrial, relacionándose con una mayor capacidad de su biosíntesis y, por tanto, con una mayor actividad enzimática relacionada con el metabolismo de estos compuestos. En

consecuencia, estas cepas salvajes no sólo van a presentar un mayor potencial enzimático sino que también producirán otros compuestos volátiles o diferentes perfiles aromáticos (Ayad *et al.*, 1999; Ayad, 2008; Smit *et al.*, 2009).

Basados en la capacidad que presentan las estirpes naturales de *L. lactis* para crecer con bajos requerimientos nutricionales, sobre todo de aminoácidos, hemos estudiado en *L. lactis* IFPL730 el efecto del contenido en BCAAs en el medio de crecimiento sobre la expresión de genes que están relacionados con la conversión de aminoácidos y formación de compuestos del aroma. Este estudio nos permitirá por un lado conocer las posibilidades de regulación de los genes diana y, por otro, predecir el comportamiento de la estirpe evaluada sobre la capacidad de formar compuestos responsables del aroma en el queso.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Microorganismo y condiciones de cultivo

El microorganismo utilizado en este estudio fue *Lactococcus lactis* IFPL730, una cepa silvestre aislada de quesos de leche cruda de cabra (Fontecha *et al.*, 1990). La cepa fue crecida en caldo M-17 (Pronadisa) suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa (G-M17) durante 18-24 horas a 30 °C en condiciones de aerobiosis.

Para estudiar la influencia del contenido de aminoácidos de cadena ramificada en el medio de cultivo, se realizaron crecimientos en un medio químicamente definido (CDM) donde se varió la concentración de estos aminoácidos. Para ello, se inoculó *L. lactis* IFPL730 al 1% (v/v) en G-M17 y se incubó a 30 °C durante 15 horas. Pasado el tiempo de incubación, las células se sedimentaron por centrifugación (4.000 *g*, 15 min, 4 °C), se lavaron dos veces en las mismas condiciones y finalmente se resuspendieron en solución salina, para después realizar los inóculos en CDM al 1% (v/v). El CDM empleado está basado en los medios químicamente definidos descritos con

anterioridad (Otto *et al.*, 1983; Poolman y Konings, 1988) y cuya composición se resume en la Tabla 3.1. Las diferencias respecto al contenido en BCAAs fueron las siguientes: CDM basal contenía todos los aminoácidos; CDM-Ile no contenía isoleucina; CDM-Val contenía 10 veces menos el contenido normal de valina (0,033 g/L); y CDM-LEU contenía 100 veces menos el contenido normal de leucina (0,0047 g/L).

Tabla 3.1. Composición del medio químicamente definido

Producto	Concentración (g/L)	Producto	Concentración (g/L)
<i>Aminoácidos</i>		<i>Vitaminas y bases</i>	
Alanina	0,24	Ác. fólico	0,001
Arginina	0,12	Ác. lipoico	0,0025
Asparragina	0,35	Ác. nicotínico	0,01
Cisteína	0,17	Ác. orótico	0,005
Fenilalanina	0,28	Ác. p-aminobenzoico	0,01
Glicina	0,17	Biotina	0,01
Glutamato	0,03	Cianocobalamina (B12)	0,001
Glutamina	0,51	Inosina	0,005
Histidina	0,11	Pantotenato de calcio	0,001
Isoleucina	0,20	Piridoxina (B6)	0,002
Leucina	0,47	Piridoxamina	0,005
Lisina	0,35	Riboflavina (B2)	0,001
Metionina	0,12	Tiamina	0,001
Prolina	0,68	Timidina	0,005
Serina	0,34	Adenina	0,01
Tirosina	0,29	Guanina	0,01
Treonina	0,23	Uracilo	0,01
Triptófano	0,05	Xantina	0,01
Valina	0,33		
<i>Sales minerales (I)</i>		<i>Sales minerales (II)</i>	
Acetato sódico	1	MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,2
Citrato amónico	0,6	FeCl ₂ , 4H ₂ O	0,011
KH ₂ PO ₄	9	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,05
K ₂ HPO ₄	7,5	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,005
		CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,0025
<i>Azúcar</i>			
Glucosa	5		

3.2.2. Crecimiento celular, recuentos y pH

El crecimiento de *L. lactis* IFPL730 fue determinado espectrofotométricamente por triplicado en microplacas estériles de 96 pocillos con tapa (Sarstedt), conteniendo 300 µL de medio de cultivo (CDM, CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu) e inoculado al 1%

(v/v). El crecimiento durante 24 h a 30 °C fue seguido mediante medida de la densidad óptica a 480 nm (DO_{480}) a intervalos de 60 min usando un lector de microplacas automático (*Varioskan Flash*, Thermo Fisher Scientific). Los datos de DO_{480} sirvieron para calcular la tasa máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) mediante la fórmula $\mu = \Delta \ln DO_{480} / \Delta t$, donde Δt representa el incremento de tiempo (expresado en horas) entre dos medidas de DO_{480} .

Para el estudio de expresión génica y el análisis de compuestos volátiles se emplearon cultivos de un volumen de 300 mL de *L. lactis* IFPL730 en los CDMs con diferente contenido en aminoácidos. Muestras tomadas de estos cultivos a diferentes etapas de la curva de crecimiento sirvieron para llevar a cabo los recuentos en placa y las medidas de pH. Para los recuentos de *L. lactis*, se tomó 1 mL de cultivo, se diluyó en solución salina (0,85%) y se plaqueó sobre el medio agar G-M17 (medio GM17 al que se le añadió agar bacteriológico al 1,5%). El tiempo de incubación se extendió a 48 h a 30 °C. A fin de evitar variaciones que pudieran afectar a la expresión génica, el pH de los CDMs fue ajustado a 7,2 con ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico (MOPS) 0,19 M. No obstante, diferentes medidas de pH fueron llevadas a cabo a partir de 3 ml de muestra de los cultivos a lo largo del crecimiento.

3.2.3. Extracción de ARN y transcripción inversa

El ARN total de los cultivos de *L. lactis* IFPL730 crecidos en los CDMs con diferente contenido en aminoácidos fue extraído a diferentes tiempos durante la curva de crecimiento: (1) inicio de la fase exponencial; (2) final de la fase exponencial; y (3) fase estacionaria tardía. El ARN fue purificado utilizando el kit *RNeasy* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando el protocolo para insertar un paso inicial de lisis enzimática con lisozima (50 mg/mL) y mutanolisina (200 U/mL). Previo a la sedimentación por centrifugación (10.000 *g*, 10 min), las células fueron tratadas con *RNA protect bacteria reagent* (Qiagen) a fin de proteger y estabilizar el ARN. La concentración de ARN fue calculada midiendo la absorbancia a 260 nm usando el espectrofotómetro SmartSpec Plus (Bio-Rad). Otra medida de absorbancia, a 280 nm, fue realizada para establecer la calidad del ARN extraído mediante el cociente

260/280, que indica el contenido residual de proteínas. Se incluyeron en el estudio aquellas muestras de ARN con un cociente 260/280 entre 1,8-2,0.

Antes de proceder con la transcripción inversa, el ARN fue tratado con ADNasa (*DNase Treatment and Removal Reagents*, Ambion) para eliminar los posibles restos de ADN en las muestras. La síntesis del ADN complementario (ADNc) fue realizada usando el sistema *ThermoScript RT-PCR* (Invitrogen). La mezcla de reacción (20 µL) contenía 1 µg de ARN, 50 ng/µL de *random hexamers*, 10 mM de la mezcla de dNTPs, tampón de síntesis al 5×, 0,1 M de DTT, 40 U de *ARNasa OUT* y 15 U de *ThermoScript RT*. El protocolo térmico fue el siguiente: desnaturalización a 65 °C (5 min), estabilización a 25 °C (5 min), retrotranscripción a 50 °C (50 min) e inactivación de la transcriptasa inversa a 85 °C (5 min).

3.2.4. Medida de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (RTi-PCR)

3.2.4.1. Diseño de cebadores y evaluación de su especificidad y eficiencia

Los cebadores utilizados en este estudio (Tabla 3.2) se diseñaron a partir de la secuencia del genoma de *L. lactis* IL 1403 (GenBank Nº acceso AE005176) (Bolotin *et al.*, 2001) y del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 (GenBank Nº acceso AJ746364.1), empleando la aplicación *Primer-Blast* (NCBI). Los cebadores fueron diseñados para amplificar secciones definidas y específicas de cinco genes que participan en el catabolismo de aminoácidos (Fig. 3.1) y del gen *tuf*, que codifica para el factor de elongación Tu en *L. lactis* y que fue usado como gen de referencia. Así, se diseñaron unos cebadores con una longitud de entre 17-23 bases, con una T_m de entre 50-52 °C y evitando la formación de dímeros y estructuras secundarias. Los amplicones generados oscilan entre 148-233 pares de bases (pb).

Para comprobar la presencia de estos genes de interés en *L. lactis* IFPL730, así como la especificidad de los cebadores se llevó a cabo una amplificación por PCR con

ADN genómico. El ADN se obtuvo empleando el sistema Qiagen (*QIAamp DNA Stool Mini Kit*), siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo una lisis mecánica previa a la purificación, tal y como describen García-Cayuela *et al.* (2009). La reacción de PCR (50 µL) contenía 200 µM de cada deoxinucleósido trifosfato, 0,4 µM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂, tampón de reacción al 1×, 2,5 U de enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen) y 500 ng de ADN genómico de *L. lactis* IFPL730. El programa de amplificación fue el siguiente: 94 °C durante 3 min; 30 ciclos de 94 °C (30 s), 52 °C (20 s) y 72 °C (20 s); y una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los productos generados (5 µL) fueron separados en un gel de agarosa (2%) y se comparó la longitud de los amplicones con los tamaños esperados (Tabla 3.2).

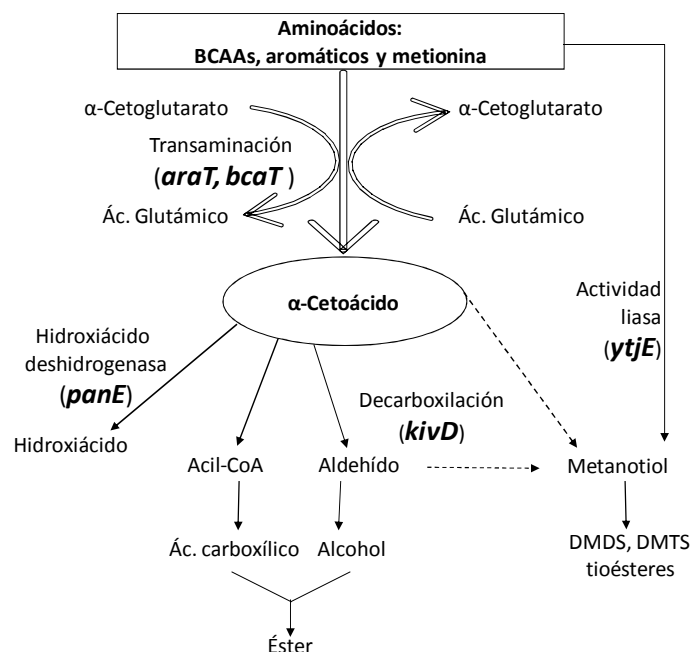


Figura 3.1. Esquema general del catabolismo de aminoácidos en *L. lactis*. Los genes de interés en este estudio se representan en negrita y en cursiva (Adaptado de Requena y Peláez, 2007).

La eficiencia de reacción (E) o capacidad para duplicar el número de amplicones obtenidos en cada ciclo de amplificación por RTi-PCR fue determinada para cada pareja de cebadores (Tabla 3.2). Se realizaron curvas estándares por RTi-PCR a partir de diluciones seriadas con ADNc procedente de ARN extraído del cultivo de *L. lactis*

IFPL730 crecido en CDM. La eficiencia de cada pareja de cebadores se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E=10^{(-1/\text{pendiente})}-1.$$

Tabla 3.2. Cebadores empleados.

Gen	Cebadores	Secuencias 5'→3'	Amplicón (pb)	Eficiencia de RTi-PCR ^a
<i>araT</i>	aratfor	GTTTGACCAACAGGTTTCAT	220	1,85
	aratrev	AATTTTCATCTTCTGCTGCAT		
<i>bcaT</i>	bcatfor	TTCCGTCCTGACCAAAATG	187	1,96
	bcatrev	GCACCCGTTCCGTAAGG		
<i>kivD</i>	kivdfor	AAGCCAAATTGCAGATAAAG	174	1,89
	kivdrev	CTTTGATTGGCCCATGAAT		
<i>ytjE</i>	ytjefor	CCATTCACTTCCATTTTCAT	176	1,87
	ytjerev	TATCTTCTGCCACCAAAAAGT		
<i>panE</i>	panefor	AATTATTTGGTGTGGTTGG	233	1,87
	panerev	CATATCATGTGCTGGTTTTG		
<i>tuf</i>	tuffor	GCGTTCTGGAGTTGGGATGT	148	1,78
	tufrev	CCTCTTGAGCGAATACGATT		

^a Un valor de 2 equivale a una eficiencia del 100%

3.2.4.2. Reacción de RTi-PCR

La RTi-PCR se llevó a cabo en un equipo *iQTM5 Multicolor Real-Time PCR detection system Cyclor* (Bio-Rad). En la reacción de RTi-PCR se utilizaron 1 µl del ADNc, 0,3 µl de cada uno de los cebadores específicos (20 µM) y 12,5 µl de la mezcla maestra *IQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), completando el volumen de reacción hasta 25 µl con agua milliQ estéril. Cada ADNc fue amplificado con los cebadores específicos que aparecen en la tabla 3.2. En cada análisis se incluyeron dos controles negativos, uno contenía ARN tratado con ADNasa y el otro, la mezcla de reacción sin el ADNc. El protocolo térmico fue: desnaturalización previa a 98 °C (2 min), seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 98 °C (10 s), de hibridación a 52 °C (30 s) y elongación a 72 °C (60 s). Las medidas de fluorescencia se realizaron en cada ciclo en el paso de elongación. Para detectar posibles productos inespecíficos y/o la aparición de dímeros de cebadores se programó al final de cada reacción de RTi-PCR una curva de *melting* entre 50 y 95 °C (0,5 °C/s).

3.2.4.3. Análisis de los resultados obtenidos mediante RTi-PCR

Cada reacción de RTi-PCR va asociada a un ciclo umbral (C_T), definido como el ciclo en el que se empieza a detectar un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base. En este estudio, la señal de base que se estableció como óptima fue la generada automáticamente por el software del equipo de RTi-PCR.

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el método descrito por Pfaffl (2001), donde se tienen en cuenta las eficiencias de reacción de los cebadores empleados para amplificar tanto los genes en estudio como los genes de referencia. El nivel de expresión relativa o ratio fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio} = (E_{\text{muestra}})^{\Delta C_T \text{ muestra (control-muestra)}} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_T \text{ ref (control-muestra)}}$$

En esta ecuación el ratio del gen en estudio se expresa en una muestra frente a un control en comparación con un gen de referencia: E_{muestra} representa la eficiencia de reacción de los cebadores empleados para amplificar el gen en estudio; E_{ref} representa la eficiencia de reacción de los cebadores empleados para amplificar el gen de referencia; $\Delta C_{T\text{muestra}}$ es la desviación en C_T del control menos la muestra del gen en estudio; y $\Delta C_{T\text{ref}}$ es la desviación en C_T del control menos la muestra del gen de referencia. En este caso, la condición control se corresponde con los crecimientos en CDM, y la muestra, con los crecimientos en CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu. Las eficiencias para cada pareja de cebadores (Tabla 3.2) se calcularon de acuerdo con lo indicado en el apartado 3.2.4.1. La expresión génica fue inducida o reprimida cuando el ratio fue superior o inferior a 1, respectivamente.

El gen de referencia utilizado en este estudio para la normalización de los datos fue el gen *tuf* de *L. lactis*, que codifica para el factor de elongación Tu. Para confirmar la aptitud de este gen como referencia se determinó su expresión a distintos tiempos a lo largo de la curva de crecimiento y en diferentes CDMs. Todas los ΔC_T entre dos muestras fueron igual o inferior a 1, lo cual, validó al gen *tuf* como control interno (resultados no mostrados).

Los ensayos fueron llevados a cabo sobre muestras de ADNc sintetizado del ARN procedente de 3 cultivos independientes de *L. lactis* IFPL730 crecido en los diferentes CDMs. Las reacciones de RTi-PCR se realizaron por triplicado para cada gen.

3.2.5. Análisis de compuestos volátiles por SPME-GC-MS

Los compuestos volátiles producidos por *L. lactis* IFPL730 tras 30 h de incubación (fase estacionaria tardía) en CDMs con diferente contenido en aminoácidos fueron analizados mediante microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS). Para ello, se utilizaron los sobrenadantes de cada cultivo procedentes de las muestras extraídas para la expresión génica en esa fase de crecimiento. De cada sobrenadante se dispusieron 3 mL en viales, añadiéndoles 4-metil-2-pentanol (concentración final de 4 mg/L) como control interno (CI). Las muestras fueron acondicionadas durante 5 min a 60 °C y expuestas a una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilxiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco) durante 10 min. Después, la fibra fue insertada en el inyector del cromatógrafo durante 5 min para la desorción de la muestra, sobre una columna Hp-INNOWAX 136 de 60 m x 0,25 mm x 0,50 µm (Agilent) y con un flujo de helio de 54 mL/min. La temperatura del horno fue mantenida a 40 °C durante 2 min, y programada para aumentar en 5 °C/min hasta 70 °C. Se mantuvo en esta temperatura durante 2 min antes de incrementar de nuevo hasta 240 °C a una frecuencia de 10 °C/min. Finalmente se mantuvo a esta última temperatura durante 10 min. El detector de masas escaneó en el rango 29-500 m/z a una velocidad de 1,1 scans/s. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros con los contenidos en la base de datos NIST98 del soporte informático (Chem-Station Software, Agilent). Los resultados fueron expresados como abundancia relativa respecto del CI (porcentaje del área de pico del compuesto sobre la del CI). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS versión 15.0. El análisis de la varianza (ANOVA) y el método *Tukey test* fueron usados para localizar diferencias significativas, estableciendo un intervalo de confianza del 95% ($P < 0,05$).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Crecimientos de *L. lactis* IFPL730 en CDMs con diferente contenido en BCAAs

La habilidad de *L. lactis* IFPL730 para crecer en varios CDMs, cuyas diferencias se basan en el contenido en BCAAs, fue comparada a través de la curva de crecimiento (Fig. 3.1). Estudios previos en nuestro laboratorio indicaron que esta cepa es auxotrófica para valina y leucina, de ahí que en este estudio se utilizaron CDMs con un contenido mínimo de estos aminoácidos que permitían el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 (0,033 g/L de valina y 0,0047 g/L de leucina en CDM-Val y CDM-Leu, respectivamente). La ausencia de isoleucina o la mínima cantidad de valina o leucina repercutió en el crecimiento, como puede observarse al comparar la DO_{480} en estas condiciones con la obtenida en el CDM que contenía todos los aminoácidos (Fig. 3.1). De hecho, puede observarse que el periodo de latencia en CDM (~3h) fue marcadamente menor que en el resto de CDMs (~6-8h), evidenciándose la necesidad de adaptación de la cepa a cada una de las deficiencias encontradas. Además, la densidad celular máxima de los cultivos también varió en función del medio de crecimiento, oscilando entre una DO_{480} de 0,80 para CDM-Leu y de 1,71 para CDM. De forma análoga, la tasa de crecimiento máxima fue obtenida con CDM y la mínima con CDM-Leu, siendo idéntica para CDM-Ile y CDM-Val (Tabla 3.3).

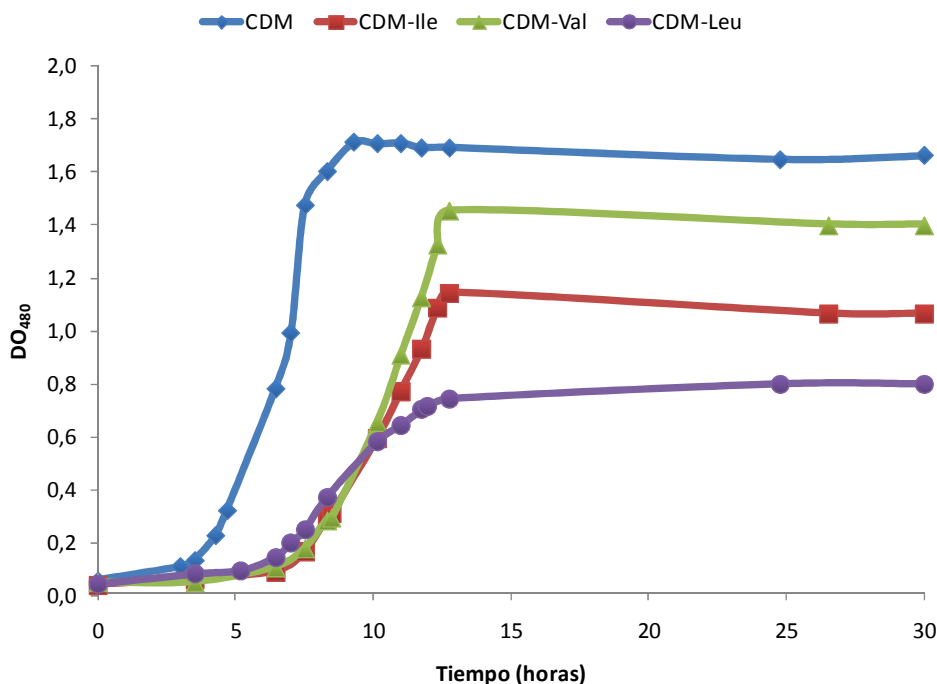


Figura 3.2. Curvas de crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en diferentes medios químicamente definidos basados en el contenido en aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs): CDM, todos los BCAA están presentes; CDM-Ile, la isoleucina está ausente; CDM-Val, el contenido de valina está reducido a un 10% del contenido basal; CDM-Leu, el contenido en leucina está reducido a un 1% del contenido basal. Las curvas fueron obtenidas a partir de 3 repeticiones biológicas con cada medio, presentando un coeficiente de variación en un rango de entre 0,1 y 9% para todas las condiciones.

Tabla 3.3. Tasa de crecimiento máxima [μ_{\max} (h^{-1})] calculada a partir de los datos de densidad óptica a 480 nm obtenidos durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	μ_{\max} (h^{-1})
CDM (medio químicamente definido basal)	1,10
CDM-Ile (CDM sin isoleucina)	0,69
CDM-Val (CDM con contenido mínimo de valina)	0,69
CDM-Leu (CDM con contenido mínimo de leucina)	0,55

De manera complementaria se llevaron a cabo recuentos en placa y medidas de pH durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 a diferentes tiempos (Tabla 3.4), que se correspondieron con aquellos en los que se realizaron los estudios de expresión génica: inicio de la fase exponencial, final de la fase exponencial y fase estacionaria tardía, e incluyendo los valores correspondientes al inicio del experimento. Los valores de los recuentos obtenidos fueron muy similares para todas las condiciones de crecimiento estudiadas, alcanzando en la fase estacionaria recuentos que oscilaban

entre 1,51 y $4,48 \times 10^9$ UFC/mL. Por otro lado, el nivel de acidificación de los cultivos estuvo controlado gracias al tampón MOPS, siendo la variación máxima de los valores de pH durante todo el crecimiento de 0,5 (Tabla 3.4). Esta variación no se considera que pueda afectar a los valores de expresión de los genes de interés.

Tabla 3.3. Recuentos en placa^a y medidas de pH^a en varias etapas^b del crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en diferentes medios de cultivo^c. (Tiempo-0, inicio del experimento; Tiempo-1, inicio fase exponencial; Tiempo-2, final fase exponencial; Tiempo-3, fase estacionaria)^a.

	TIEMPO-0	TIEMPO-1	TIEMPO-2	TIEMPO-3
Recuentos en placa (log UFC/mL)				
CDM	7,17 ± 0,03	8,36 ± 0,02	9,45 ± 0,05	9,65 ± 0,04
CDM-Ile	7,25 ± 0,12	8,53 ± 0,08	9,26 ± 0,09	9,37 ± 0,11
CDM-Val	7,26 ± 0,09	8,50 ± 0,10	9,47 ± 0,07	9,58 ± 0,07
CDM-Leu	7,33 ± 0,13	8,63 ± 0,03	9,02 ± 0,22	9,18 ± 0,01
pH				
CDM	7,18 ± 0,01	7,10 ± 0,01	6,77 ± 0,01	6,76 ± 0,01
CDM-Ile	7,19 ± 0,01	7,10 ± 0,01	6,96 ± 0,06	6,75 ± 0,04
CDM-Val	7,18 ± 0,09	7,07 ± 0,03	6,86 ± 0,03	6,75 ± 0,04
CDM-Leu	7,19 ± 0,01	7,07 ± 0,06	6,99 ± 0,02	6,81 ± 0,03

^aLos valores representan el promedio con la desviación estándar procedente de 3 repeticiones biológicas.

^bEtapas del crecimiento: Tiempo-0, inicio del experimento; Tiempo-1, inicio fase exponencial; Tiempo-2, final fase exponencial; Tiempo-3, fase estacionaria.

^cMedios de cultivo: CDM, todos los BCAA están presentes; CDM-Ile, la isoleucina está ausente; CDM-Val, el contenido de valina está reducido a un 10% del contenido basal; CDM-Leu, el contenido en leucina está reducido a un 1% del contenido basal.

3.3.2. Especificidad y eficiencia de los cebadores empleados para amplificar los genes de interés en *L. lactis* IFPL730

Antes de iniciar el análisis de expresión se llevó a cabo el estudio de especificidad y eficiencia de los cebadores diseñados (Tabla 3.2). Se confirmó en un gel de agarosa que la longitud de los amplicones generados por PCR con cada pareja de cebadores a partir de ADN de *L. lactis* IFPL730 presentaban los tamaños esperados (resultados no mostrados). Además, el análisis de las curvas de *melting* obtenidas por RTi-PCR para cada pareja de cebadores no reveló la formación de ningún fragmento inespecífico que interfiriera durante la lectura de fluorescencia.

Por otra parte, el análisis por RTi-PCR de diluciones decimales del ADN^c procedente de una cantidad conocida de células a partir de un cultivo de *L. lactis*

IFPL730 crecido en CDM generó rectas de calibrado para cada pareja de cebadores con valores de eficiencia en un rango de 1,78 a 1,96 (Tabla 3.2). Con objeto de minimizar los errores en la evaluación de la expresión génica y dada la diferencia existente entre los valores de eficiencia, se empleó el método Pfaffl (Pfaffl, 2001), utilizado normalmente para la determinación de expresión de los genes de estudio cuando las eficiencias de los cebadores empleados son diferentes a 2.

3.3.3. Expresión relativa de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en medios de cultivo con diferente concentración de aminoácidos ramificados

Para estudiar el efecto del contenido en aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en el medio de crecimiento sobre la expresión de los genes que codifican a las enzimas AraT, BcaT, KivD, YtjE y PanE, implicadas en el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* (Fig. 3.1), se llevaron a cabo análisis de expresión génica por RTi-PCR. Los resultados de expresión obtenidos en el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en los medios con diversas carencias de BCAAs (CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu) fueron comparados con los del crecimiento en CDM con todos los aminoácidos (Fig. 3.3). Además, con objeto de analizar la evolución de la expresión génica a través del tiempo se analizaron muestras procedentes de diferentes etapas de crecimiento: inicio de la fase exponencial (Tiempo-1), final de la fase exponencial (Tiempo-2) y fase estacionaria (Tiempo-3). En este sentido, se observó que la expresión relativa de todos los genes en estudio aumentó de forma generalizada en *L. lactis* crecido en CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu durante las etapas de crecimiento correspondientes a los Tiempos-2 y 3 (a partir del final de la fase exponencial), en comparación con los obtenidos en la primera etapa (Tiempo-1). Durante el inicio de la fase exponencial, las diferencias de expresión de todos los genes encontradas entre el crecimiento en los CDMs con diferencias en el contenido en BCAAs y el CDM basal fueron mínimas (Fig. 3.3).

Durante la fase exponencial de crecimiento (Tiempo-2), la expresión de los genes en estudio evolucionó en función del medio de cultivo. Los valores de expresión relativa obtenidos para los genes *kivD*, *ytjE* y *panE* tanto en CDM-Ile como en CDM-Val

fueron significativamente diferentes en relación a los obtenidos en CDM-Leu. Sin embargo, al comparar los ratios de expresión de *araT* y *bcaT* obtenidos durante el crecimiento en el Tiempo 2 en CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos.

El gen que presentó los ratios de expresión más elevados en esta fase de crecimiento, tanto en ausencia de isoleucina como en carencia de valina, fue *kivD*, alcanzando valores de 4,20 y 6,46, respectivamente, e indicando una clara inducción del gen por ausencia o carencia de estos aminoácidos en el medio de crecimiento. Aunque la diferencia de los ratios fue de 2 aproximadamente, no se apreciaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en CDM-Ile y CDM-Val para *kivD*, es decir, que el nivel de inducción de la expresión de *kivD* ocurrió por igual durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en estos dos medios. Un comportamiento similar se observó para *ytjE* y *panE*, aunque los valores de expresión relativa fueron algo menores (Fig.3.3).

Asimismo, la expresión de *araT* en los tres medios (CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu) durante la fase exponencial experimentó una pequeña inducción, con valores de ratio en un rango de 2,19 a 2,67, aunque como se ha mencionado anteriormente, no se encontraron diferencias significativas entre los CDMs. Por otro lado, la expresión relativa de *bcaT* durante el Tiempo 2 fue inducida hasta 4 veces durante el crecimiento en CDM-Leu (Fig. 3.3). La inducción de la expresión de los genes *araT* y *bcaT* (ratios de 2,67 y 4,01, respectivamente) en CDM-Leu en esa etapa de crecimiento contrastó con la represión observada para *kivD* y *panE*, al presentar unos valores de ratio inferiores a 1. Esto podría reflejar la importancia en *L. lactis* de las aminotransferasas AraT y BcaT en la etapa exponencial de crecimiento en un medio con limitaciones en el contenido de leucina.

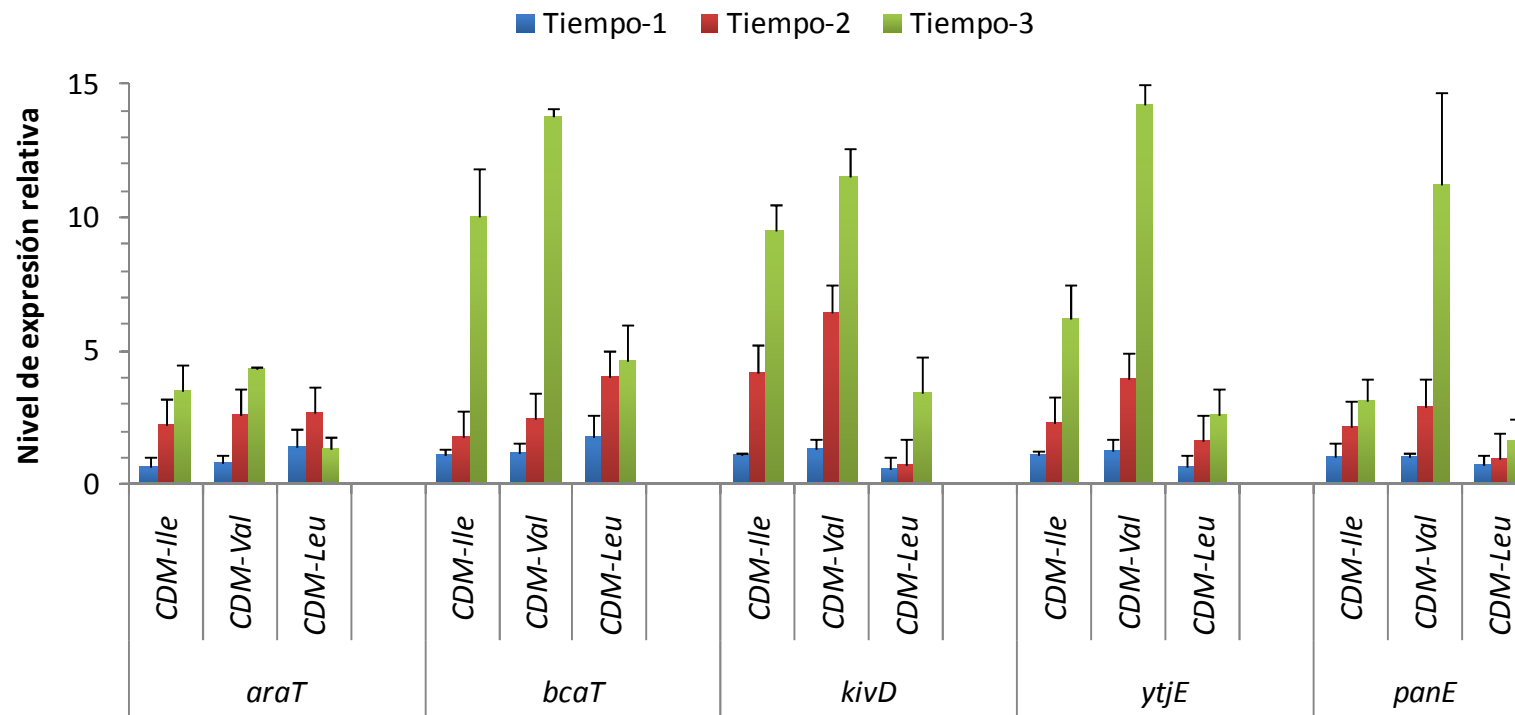


Figura 3.3. Comparación de los niveles de expresión relativa de varios genes en *L. lactis* IFPL730 crecido en un medio químicamente definido (CDM) con diferencias en el contenido de aminoácidos (CDM-Ile, en ausencia de isoleucina; CDM-Val, el contenido de valina fue reducido a un 10% del contenido basal; CDM-Leu, el contenido de leucina fue reducido a un 1% del contenido basal) y en distintas etapas de la curva de crecimiento (Tiempo-1, fase de latencia; Tiempo-2, fase exponencial; Tiempo-3, fase estacionaria). La condición de crecimiento en CDM (conteniendo todos los aminoácidos de cadena ramificada) fue definida como control para calcular los ratios. Los resultados obtenidos proceden de 3 repeticiones biológicas.

Durante la fase estacionaria (Tiempo-3) se alcanzaron los valores máximos de expresión para todos los genes, mostrando una evidente inducción en todas las condiciones de crecimiento. A diferencia de los resultados obtenidos en el Tiempo 2, todos los genes presentaron un patrón de expresión común durante el Tiempo 3, caracterizado por alcanzar valores de expresión relativa superiores durante el crecimiento en CDM-Ile y CDM-Val, en comparación con los obtenidos en CDM-Leu (Fig. 3.3). La ausencia de isoleucina o la carencia de valina generaron diferencias significativas en la expresión de *ytjE* y *panE*, mostrando ambos genes unos valores de ratios superiores en CDM-Val de hasta 8 veces con respecto al crecimiento en CDM-Ile. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la inducción de la expresión de *araT*, *bcaT* y *kivD* entre el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en CDM-Ile y CDM-Val. Son destacables los valores altos de expresión relativa obtenidos durante la fase estacionaria en esos dos CDMs para *bcaT* y *kivD*, alcanzando unos ratios en un rango de 9-14, sugiriendo una regulación común ante la falta de BCAAs

3.3.4. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles producidos por *L. lactis* IFPL730 durante el crecimiento en medios de cultivo con diferente concentración de aminoácidos ramificados

El análisis por microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a cromatografía de gases (GC) y espectrometría de masas (MS) permitió la identificación total de 17 compuestos orgánicos volátiles (COVs) (5 aldehídos, 7 cetonas, 2 alcoholes, 2 ácidos carboxílicos y 1 éster) generados durante 30 h de crecimiento (fase estacionaria, Tiempo-3) de *L. lactis* IFPL730 en diferentes medios de cultivo (CDM, CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu) (Fig. 3.4). El crecimiento en las diferentes condiciones se vio reflejado con cambios en los compuestos detectados. En este sentido, el número de COVs producidos por *L. lactis* IFPL730 en los diferentes CDMs fue variable, dependiendo del medio de cultivo. Por ejemplo, el crecimiento en CDM-Leu originó tan sólo 5 compuestos volátiles (2 aldehídos, 1 alcohol, 1 cetona y 1 ácido carboxílico) de los 17 identificados en total.

El aldehído 2-metilbutanal, que proviene de la isoleucina, sólo fue identificado en los cultivos en condiciones de crecimiento en CDM y en CDM-Leu, obteniendo unas abundancias relativas algo bajas en comparación con aquellas obtenidas por otros COVs en esas condiciones. Por otra parte, el compuesto 3-metilbutanal, que proviene de la leucina, fue producido abundantemente por *L. lactis* IFPL730 en todos los CDMs, excepto en CDM-Leu, donde no fue detectado. El medio CDM-Leu contenía una mínima parte de leucina (un 1% del contenido existente en CDM), por lo que es probable que IFPL730 al crecer en ese medio redirigiera el contenido intracelular de leucina a favor de procesos biosintéticos relacionados con el crecimiento en detrimento de procesos catabólicos. La abundancia del 3-metilbutanal durante el crecimiento en CDM-Ile fue algo más del doble que la obtenida en CDM ($55,0 \pm 5,0$ frente a $21,4 \pm 2,8$). Otro aldehído, el benzaldehído, que deriva del aminoácido aromático fenilalanina, no fue generado durante el cultivo en CDM, aunque sí fue detectado tras el crecimiento en medios de cultivo con diferente concentración de BCAAs (Fig. 3.4). La abundancia relativa del benzaldehído fue muy similar en CDM-Ile, CDM-Val y CDM-Leu, lo que concuerda con los datos de expresión obtenidos por RTi-PCR para el gen *araT* (que codifica para una aminotransferasa específica de aminoácidos aromáticos). En relación a los demás aldehídos identificados, se observaron unos valores mínimamente superiores en los crecimientos en CDM-Ile con respecto a los obtenidos en CDM, pero sin llegar a ser estadísticamente significativos.

Referente a las cetonas detectadas durante el crecimiento, hay que destacar la abundancia obtenida por 2-butanona y 6-metil-2-heptanona (Fig. 3.4), observándose una clara diferencia entre el cultivo de *L. lactis* IFPL730 en CDM y en el resto de medios. Una cetona que se generó en los cuatro medios fue la 2,3-pentanediona, derivada del α -aceto- α -hidroxibutirato (un intermediario de la biosíntesis de isoleucina), mostrando una abundancia significativamente mayor en CDM-Leu que en el resto de medios. Además, los compuestos 2,3-heptanediona y 5-hidroxi-2,7-dimetil-4-octanona presentaron abundancias similares en CDM-Ile y CDM-Val, representando más del doble que las obtenidas en CDM (Fig. 3.4).

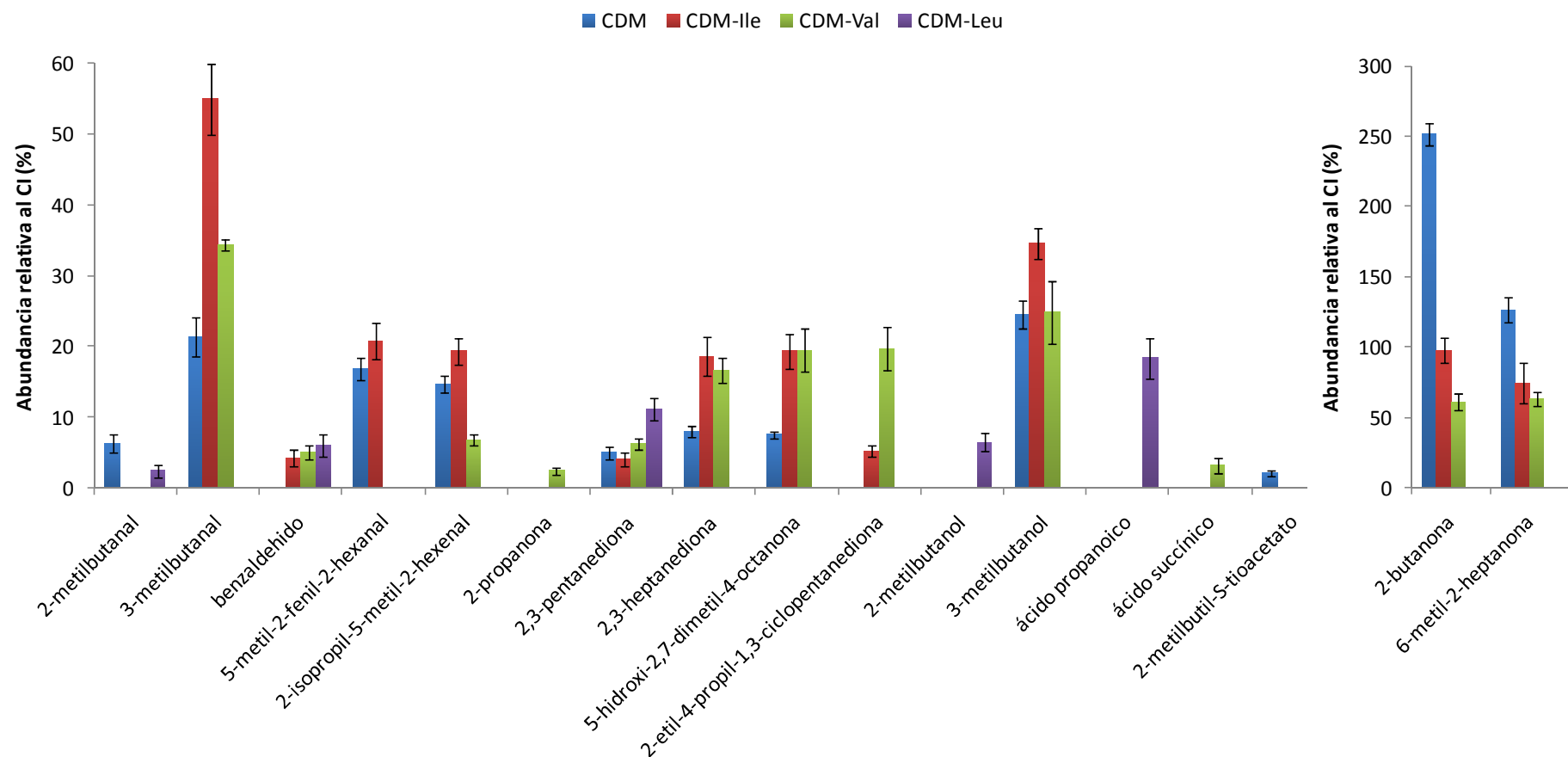


Figura 3.3. Compuestos volátiles producidos por *L. lactis* IFPL730 tras 30 horas de crecimiento en diferentes medios químicamente definidos (CDMs) basados en el contenido en aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs): CDM, contenía todos los BCAA; CDM-Ile, en ausencia de isoleucina; CDM-Val, el contenido de valina fue reducido a un 10% del contenido basal; CDM-Leu, el contenido de leucina fue reducido a un 1% del contenido basal. Los datos representan las abundancias relativas (%) respecto del 4-metil-2-pentanol (control interno, CI) procedentes de 3 repeticiones biológicas.

Por otro lado, los únicos compuestos alcohólicos que se detectaron en los cultivos de *L. lactis* IFPL730 en los diferentes CDMs fueron el 2-metilbutanol y el 3-metilbutanol, generados tras la reducción del 2-metilbutanal y 3-metilbutanal, respectivamente (Fig. 3.4.). En este sentido, el 2-metilbutanol sólo se detectó en los cultivos de CDM-Leu, mientras que el 3-metilbutanol se detectó en todos los cultivos excepto en CDM-Leu. Al igual que ocurría con su correspondiente aldehído, el 3-metilbutanal, la abundancia del 3-metilbutanol durante el crecimiento en CDM-Ile fue más alta que la obtenida en CDM ($24,52 \pm 1,98$ frente a $34,50 \pm 2,18$).

En relación a los demás compuestos, como se puede observar en la Fig. 3.4, aparecieron de forma aislada. Por ejemplo, el ácido propanoico sólo se detectó en el cultivo de CDM-Leu, el ácido succínico sólo en CDM-Val y el ácido 2-metilbutil-S-tioacético en CDM.

3.4. DISCUSIÓN

Algunas cepas de *L. lactis*, preferentemente aquellas que han sido aisladas de ambientes naturales de origen no lácteo, pueden crecer sin excesiva dificultad en un medio que presente una cierta limitación en el contenido de aminoácidos, dado que estas bacterias dependen mayoritariamente de su propia capacidad de biosíntesis (Gitton *et al.*, 2005). En este trabajo se ha estudiado el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en varios medios de cultivo con diferencias en el contenido en BCAAs. Aunque la tasa de crecimiento máxima (μ) de la estirpe experimentó un descenso cuando fue crecida en medios con carencia de BCAAs en comparación con el medio completo, IFPL730 mostró un crecimiento óptimo en todos los medios. Los crecimientos en CDM-Ile y CDM-Val provocaron, con respecto al CDM completo, un descenso de μ en torno al 37%, mientras que el contenido mínimo de leucina provocó un descenso del 50%. Si bien la deficiencia en el medio de algún BCAA determinó cambios en μ y en los valores máximos de DO_{480} , esto no impidió que se alcanzaran recuentos superiores a 1×10^9 UFC/mL al cabo de las 30h de cultivo en todos los medios. Este resultado demuestra la

habilidad de *L. lactis* IFPL730 para reajustar sus rutas metabólicas y así poder hacer frente a la carencia de BCAAs. Estudios previos con *L. lactis* IFPL730 demostraron la auxotrofia de la cepa para leucina y valina y la capacidad para crecer en ausencia de isoleucina (De la Plaza *et al.*, 2009). La carencia de nutrientes suficientes para sostener el crecimiento de *L. lactis* puede ocurrir tanto en ambientes naturales como en medios industriales complejos (Doeven *et al.*, 2005; Savijoki *et al.*, 2006) y son numerosas las auxotrofías que se han detectado en *L. lactis* (Delorme *et al.*, 1993; Godon *et al.*, 1993; Coccagn-Busquet *et al.*, 1995). A pesar de ello, muy pocos estudios en bacterias lácticas han abordado el efecto de la carencia o la presencia de un contenido mínimo en alguno de los BCAAs sobre las enzimas implicadas en el catabolismo de aminoácidos.

En este trabajo se empleó la transcripción inversa acoplada a la RTi-PCR como método sensible para estudiar en *L. lactis* IFPL730 el efecto producido por la carencia o ausencia de BCAAs en el medio de crecimiento sobre el nivel transcripcional de genes que codifican enzimas clave en el catabolismo de aminoácidos y la formación de compuestos volátiles. Asimismo, la formación de esos compuestos fue evaluada mediante SPME y GC-MS, técnica que ha sido descrita como esencial para la caracterización del aroma de quesos o leche fermentada (Conrad *et al.*, 2004; Chammas *et al.*, 2006). Diversos estudios en relación con el catabolismo de aminoácidos en *L. lactis* (Yvon y Rijnen, 2001; Smit *et al.*, 2005a; Yvon, 2006; Fernández y Zúñiga, 2006; Requena y Peláez, 2007) nos permitieron seleccionar 5 genes para nuestros experimentos (Fig. 3.1). El gen de referencia utilizado para la normalización de los datos de expresión fue el gen *tuf*, que codifica para el factor de elongación TU y que ha sido satisfactoriamente empleado en otros estudios de expresión génica en *L. lactis* (Guédon *et al.*, 2005; Sperandio *et al.*, 2005). Los genes *araT* y *bcaT* codifican para dos aminotransferasas (específicas de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada, respectivamente) que catalizan la conversión de aminoácidos a los correspondientes α -cetoácidos, que a su vez, son los precursores para la formación de compuestos volátiles (Yvon *et al.*, 1997; Yvon *et al.*, 2000). Esos α -cetoácidos pueden actuar como sustrato para varias enzimas, como la hidroxácido deshidrogenasa, codificada por el gen *panE*, originando los correspondientes hidroxácidos (Chambellon *et al.*, 2009); y la α -cetoácido decarboxilasa (gen *kivD*), catalizando la decarboxilación

de α -cetoácidos a aldehídos (De la Plaza *et al.*, 2004). Por último, el gen *ytjE* codifica para una C-S liasa con actividad sobre aminoácidos azufrados produciendo compuestos volátiles de interés (Martínez-Cuesta *et al.*, 2006b).

La expresión relativa de los genes en estudio fue inducida por la ausencia o carencia de BCAAs en el medio de crecimiento en las etapas exponencial y estacionaria de crecimiento, no detectándose dicha inducción en la fase de latencia. Estos genes podrían estar sujetos a la regulación ejercida por el regulador global del metabolismo del nitrógeno CodY, cuya actividad represora dejaría de funcionar ante la falta de BCAAs en el medio de crecimiento (Guedon *et al.*, 2001a). Generalmente, CodY reprime en bacterias Gram-positivas la expresión de genes durante la fase logarítmica en condiciones de abundancia de nitrógeno (Sonenshein, 2005). Guedon *et al.* (2005) describieron que el principal efector de CodY era la isoleucina y que el efecto mediado por leucina o valina era más bajo o insignificante, respectivamente. Además, la expresión de las enzimas AraT y BcaT en *L. lactis* NCDO763 se ha demostrado que está regulada por CodY ante la presencia de isoleucina, y no por el contenido de valina y leucina (Chambellon e Yvon, 2003). Las afirmaciones realizadas en esos estudios coinciden en parte con las observaciones de este trabajo, debido a que no solo la carencia de isoleucina provocó la inducción de todos los genes, sino también la carencia de valina y leucina. Villapakkam *et al.* (2009) han descrito recientemente que la valina está implicada en la inducción de CodY en *B. subtilis*, y De la Plaza *et al.* (2009) mostraron que la actividad enzimática de KivD en *L. lactis* IFPL730 también está afectada por la carencia de valina y leucina en el medio de cultivo, aunque en menor proporción que por isoleucina. En los resultados del presente estudio, la falta de isoleucina o la carencia de valina son las que provocaron una mayor inducción en la expresión génica de *araT*, *bcaT*, *kivD*, *ytjE* y *panE* en comparación con la carencia de leucina. Por otra parte, al comparar la expresión de todos los genes en CDM-Leu en la fase exponencial, pudimos observar que la expresión de *araT* y *bcaT* fue inducida, mientras que para *kivD* y *panE* fue reprimida. En esa etapa de crecimiento, *L. lactis* IFPL730 utilizaría las aminotransferasas AraT y BcaT a favor de procesos biosintéticos para asegurarse un suministro de leucina, al estar creciendo con limitaciones en el contenido de este aminoácido, mientras que bloquearía las rutas catabólicas donde

participan KivD y PanE. Esto explicaría la ausencia de 3-metilbutanal durante el crecimiento en CDM-Leu. Además, la producción de compuestos volátiles fue muy reducida durante el crecimiento en CDM-Leu. Un ejemplo de la inducción de las rutas anabólicas en detrimento de las catabólicas ante una falta de nutrientes fue descrito en *L. lactis* por Dressaire *et al.* (2008).

El contenido en BCAAs en el medio de crecimiento también determinó cambios en los compuestos volátiles generados por *L. lactis* IFPL730, en parte, por consecuencia directa de los cambios ocurridos en la expresión génica. El aumento de expresión de los genes *bcaT* y *kivD* en CDM-Ile se reflejó en las abundancias obtenidas para los compuestos 3-metilbutanal y 3-metilbutanol en ese medio. El aldehído 3-metilbutanal (procedente de la leucina) ha sido identificado como un potente compuesto del aroma en quesos tipo Camembert, Cheddar, Emmental y Gruyere (Rychlik y Bosset, 2001). Por otro lado, el alcohol 3-metilbutanol, originado por reducción del 3-metilbutanal por deshidrogenasas, a pesar de estar asociado con un aroma fuerte en queso Cheddar (Dunn y Lindsay, 1985), ha sido relacionado positivamente con un aroma de caramelo en un estudio que se llevó a cabo sobre diez variedades de queso europeo (Lawlor *et al.*, 2001).

Los compuestos volátiles 2-butanona y 6-metil-2-heptanona fueron detectados en abundancia en los cultivos en CDM, con respecto al resto de medios. Estas cetonas derivan de la β -oxidación de los ácidos grasos en queso (McSweeney y Sousa, 2000), y son consideradas responsables del aroma característico de los quesos Roquefort, Camembert y Gorgonzola (Molimard y Spinnler, 1996; Curioni y Bosset 2002). Oku y Kaneda (1988) conectaron la producción de ácidos grasos con el metabolismo de BCAAs en *B. subtilis*, por lo que un contenido alto en BCAAs potenciaría la producción de ácidos grasos y su posterior degradación. Esto explicaría la abundancia encontrada de estas cetonas en CDM. Una cetona que se generó durante el crecimiento de *L. lactis* IFPL730 en todos los CDMs fue la 2,3-pentanediona, derivada del α -aceto- α -hidroxibutirato (un intermediario de la biosíntesis de isoleucina). Este compuesto ha sido detectado en quesos y se ha asociado a la actividad metabólica de *Lactobacillus helveticus* (Imhof *et al.*, 1995; Garde *et al.*, 2006).

Los resultados aquí mostrados proporcionan información sobre la expresión de genes relacionados con la conversión de aminoácidos y la formación de compuestos volátiles en *L. lactis* IFPL730 durante el crecimiento en un medio con diferencias en el contenido en BCAAs. Se ha demostrado que el contenido en BCAAs en el medio de crecimiento está implicado en la regulación de la expresión de esos genes, y en último término, a la producción de un determinado perfil de compuestos volátiles.

Capítulo 4

Análisis Genómico y Transcriptómico en *Lactococcus lactis*: Respuesta en el Metabolismo de Aminoácidos a la Carencia de Isoleucina o Glucosa en el Medio de Crecimiento

Capítulo 4

Análisis genómico y transcriptómico en *Lactococcus lactis*: respuesta en el metabolismo de aminoácidos a la carencia de isoleucina o glucosa en el medio de crecimiento

4.1. INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos son fundamentales para la supervivencia y el desarrollo de bacterias. Además de ser las principales fuentes de nitrógeno, están implicados en la producción de energía, el control del pH intracelular y la regeneración de cofactores (Ardo, 2006; Fernández y Zuñiga, 2006; Ganesan *et al.*, 2007). Esta necesidad es especialmente importante para las bacterias lácticas (BAL), donde se han descrito numerosas auxotrofías (Delorme *et al.*, 1993; Godon *et al.*, 1993; Coccagn-Busquet *et al.*, 1995). Por ejemplo, en *Lactococcus lactis* IL1403 se han descrito hasta un total de 7 auxotrofías para distintos aminoácidos (Coccagn-Busquet *et al.*, 1995). Estas auxotrofías están generalmente relacionadas con mutaciones puntuales o la presencia de genes inactivos (Delorme *et al.*, 1993; Godon *et al.*, 1993). Tanto en ambientes naturales como en medios complejos industriales, las BAL pueden enfrentarse a una carencia de aminoácidos, y para afrontar dicha carencia tienen que reajustar sus rutas metabólicas (Doeven *et al.*, 2005; Savijoki *et al.*, 2006).

Se han realizado diversos análisis transcripcionales sobre la carencia de aminoácidos en *Bacillus subtilis* (Tam le *et al.*, 2007), *Bordetella pertusis* (Nakamura *et al.*, 2006) y *Escherichia coli* (Traxler *et al.*, 2008), revelando la participación de mecanismos regulatorios aún sin caracterizar, distintos de los ya conocidos, como los mecanismos de la respuesta severa ("stringent response") o de los factores sigma. Las interacciones entre los mecanismos que determinan la expresión génica de los genes implicados en el proceso de adaptación a la carencia de aminoácidos todavía no son muy conocidas en BAL. El mecanismo de la respuesta severa, recientemente

investigado en *L. lactis* (Dressaire *et al.*, 2008), podría intervenir en la respuesta a la carencia de aminoácidos, así como mecanismos generales asociados a la regulación de la tasa de crecimiento, ya que un agotamiento en nutrientes iría asociado a una desaceleración en el crecimiento (Dressaire *et al.*, 2008). Además, el regulador CodY, como regulador general del metabolismo del nitrógeno y cuya actividad está mediada por el contenido de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en *L. lactis* (Guédon *et al.*, 2001a), puede estar también implicado en la respuesta a la carencia de aminoácidos en el medio. Otro regulador de la transcripción podría ser GlnR, recientemente identificado como un regulador del metabolismo del nitrógeno en *L. lactis* (Larsen *et al.*, 2006). Asimismo, también se ha observado la participación del regulador global del metabolismo del carbono CcpA en la regulación del metabolismo del nitrógeno y de la proteólisis en *L. lactis* MG1363 (Zomer *et al.*, 2007) y en la respuesta a la carencia de nitrógeno en *B. subtilis* (Tam le *et al.*, 2007).

La isoleucina, junto a la valina y la leucina, todos BCAAs, son los aminoácidos más abundantes en las proteínas y los principales componentes de los dominios proteicos hidrofóbicos (Garault *et al.*, 2000; Shivers y Sonenshein, 2005). En este trabajo, hemos tratado de caracterizar la respuesta de *L. lactis* a la carencia de isoleucina en el medio de crecimiento sobre el metabolismo de aminoácidos. El estudio fue abordado mediante un análisis transcriptómico con microchips sobre dos cepas de *L. lactis* en diferentes etapas del crecimiento. Adicionalmente, para determinar la posible diversidad en la expresión de genes comunes a las estirpes utilizadas se realizó un estudio de hibridación genómica comparativa (CGH).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron *L. lactis* IFPL730, de la colección del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11, ambos presentes en la colección de la Universidad del Estado de Utah, EEUU (USU). Las estirpes IFPL730 e IL1403 fueron utilizadas para el análisis transcriptómico, y para el estudio de CGH también se incluyó a SK11.

Las cepas fueron crecidas en caldo M17 suplementado con glucosa (0,5%) (GM17). Para el estudio transcriptómico, los cultivos fueron propagados dos veces a 30 °C durante 24 h en 10 mL de GM17. Seguidamente se volvieron a crecer en las mismas condiciones durante 15 h y tras este tiempo, se recogieron las células por centrifugación (4000 x g, 15 min, 4 °C). Las células sedimentadas fueron lavadas dos veces y resuspendidas en solución salina, y se inocularon al 1% en un medio químicamente definido (CDM). La composición del CDM se detalla en la tabla 3.1. (Cap. 3), aunque las vitaminas mostradas en dicha tabla fueron sustituidas por la solución comercial *Vitamin Solution 100x* (Sigma). Las variaciones en la composición del CDM se basaron en el contenido de isoleucina (Ile). De esta manera, el CDM basal (CDM), usado como control, contenía 19 aminoácidos (todos excepto el ácido aspártico) y glucosa como fuente de carbono, y CDM-Ile presentaba la misma composición pero sin isoleucina. Para evitar la aparición del estrés ácido durante el crecimiento, el pH fue ajustado a 7,2 con el tampón 3-(N-morfolino)propanesulfonato (MOPS)(Sigma).

4.2.2. Densidad celular, recuentos, viabilidad y determinación de glucosa

La determinación de varios parámetros de crecimiento como densidad celular, recuentos en placa, viabilidad y contenido de glucosa libre fueron llevadas a cabo sobre muestras tomadas de los cultivos a diferentes etapas de la curva de crecimiento. La densidad óptica fue medida a 480 nm (DO_{480}) y la tasa máxima de crecimiento (μ) (h^{-1}) se obtuvo mediante la fórmula $\mu = \Delta \ln OD_{480} / \Delta t$. Los recuentos en placa fueron determinados en agar GM17 tras una incubación durante 48 h a 30 °C. La viabilidad de las células fue analizada usando el kit de viabilidad *BacLight Live-Dead* (Invitrogen). Por último, la cantidad de glucosa libre presente en el medio de crecimiento fue cuantificada indirectamente mediante espectrofotometría empleando el kit *D-glucose test* (R-Biopharm) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.3. Extracción de ADN genómico para el estudio de hibridación genómica comparativa (CGH)

El ADN genómico fue extraído de células crecidas en GM17 durante 15h a 30 °C. Las células sedimentadas procedentes de 1,5 mL de cultivo fueron tratadas durante 1 h a 37 °C con una solución de lisis que contenía ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (50 mM), lisozima (10 mg/mL) y mutanolisina (250 U/mL). La purificación del ADN se llevó a cabo empleando el kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega) según las indicaciones del producto comercial.

4.2.4. Extracción de ARN total y transcripción inversa

El ARN total de los cultivos de *L. lactis* crecidos en los CDMs con diferente contenido en aminoácidos fue extraído a diferentes tiempos durante el crecimiento. Las suspensiones celulares para el análisis transcriptómico fueron tratadas según el protocolo descrito por Chomczynski (1993) con algunas modificaciones para la extracción del ARN total. Brevemente, las muestras fueron tratadas en seis etapas: (i) las suspensiones celulares fueron centrifugadas a 6000 x *g* y el sedimento fue tratado

con el tampón Tris: EDTA (10:1) conteniendo lisozima (50 mg/mL) y mutanolisina (200 U/mL); (ii) el lisado anterior se resuspendió en el reactivo Trizol LS (Invitrogen), logrando una completa homogeneización; (iii) se procedió a una separación de fases mediante la adición de cloroformo, recogiénose la fase superior acuosa que contenía el ARN; (iv) se precipitó el ARN con isopropanol; (v) se lavó la suspensión de ARN con etanol al 70%, eliminándose todos los restos de alcohol mediante secado de la muestra; y (vi) se suspendió el ARN con agua libre de ARNasas. La cantidad y calidad del ARN fueron determinadas usando el espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific) y el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent).

El ADN complementario (ADNc) fue obtenido a partir de 10 µg de ARN, utilizando cebadores aleatorios y la enzima *Superscriptase II* (Invitrogen). El procedimiento se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante, excepto que la mezcla de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) fue reemplazada por una mezcla de aminoalil-dNTPs (aa-dNTPs). La mezcla de aa-dNTPs (20x) estaba compuesta por: dATP (10 mM), dCTP (10 mM), dGTP (10 mM), dTTP (4 mM), ddATP (0,1 mM) (Invitrogen) y aa-dUTP (6 mM) (Sigma). Una vez que la transcripción inversa se completó, la enzima fue inactivada por calor y los cebadores de ARN fueron degradados con ARNasa H (Epicenter). El ADNc fue purificado con el kit *Qiaquick-PCR* (Qiagen), siguiendo sus indicaciones, excepto que la solución de lavado del kit conteniendo Tris fue sustituida por etanol al 75%.

4.2.5. Marcaje e hibridación del ADN o ADNc sobre el microchip

Al menos 1 µg de ADN genómico o de ADNc, con unos ratios A_{260}/A_{280} entre 1,8-2 y $A_{260}/A_{230} \geq 1,5$ fueron fragmentados durante 10 min con 0,6 U de ADNasa 1 (Promega) a 37 °C. Los fragmentos generados fueron marcados con biotina empleando el reactivo *GeneChip DNA labeling reagent* (Affymetrix) de acuerdo con las instrucciones del producto. Las muestras fueron hibridadas y detectadas en el *Center for Integrated BioSystems* (USU), empleando los protocolos definidos por Affymetrix. La hibridación se llevó a cabo empleando un microchip (Affymetrix) que contenía los

genomas completos de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11, incluyendo las regiones intergénicas.

4.2.6. Normalización, visualización y análisis estadístico de datos

Las intensidades iniciales (archivos .ccl) de todos los microchips fueron conjuntamente normalizadas con el método RMA (Robust Multichip Average) (Irizarry *et al.*, 2003), usando el módulo xCluster R (*Center for Integrated BioSystems*, USU). Esa normalización condujo a la transformación de las intensidades en valores en \log_2 , usados para los análisis estadísticos. Los ratios (LRs) fueron calculados determinando la diferencia en intensidades (\log_2) obtenidas en la muestra problema (crecimiento en CDM-IIe) con respecto a la muestra control (crecimiento en CDM). Los mapas de expresión fueron dibujados usando el módulo Hierarchical Clustering Explorer (HCE) version 3.5 (Seo y Shneiderman, 2002; 2004) teniendo en cuenta los niveles de expresión de todas las muestras, estableciéndose un cambio de color cuando las diferencias en expresión fueron superiores o inferiores a 1,5. Las diferencias significativas en los cambios de expresión fueron calculadas con el programa estadístico multivariable *Significance Analysis for Microarrays* (SAM) (Tusher *et al.*, 2001), ajustando el *false discovery rate* (FDR) al 25% ($q \leq 0,25$).

4.2.7. Validación del microarray y determinación de la identidad de secuencia (IS)

La validación y la posible variación tecnológica del microarray se llevaron a cabo comparando las réplicas de las hibridaciones de las cepas control, *L. lactis* IL1403 y *L. cremoris* SK11. La divergencia o la conservación de los genes en *L. lactis* IFPL730 con respecto a las cepas control fue determinada a través del análisis de identidad de secuencia (IS), empleando la siguiente fórmula: $SI = I_{730} - I_{1403/SK11}$, donde I corresponde a la intensidad detectada de cada gen en \log_2 . Se asumió la conservación de genes en *L. lactis* IFPL730 cuando los valores de SI fueron $\geq -1,2$ ó $< 1,2$.

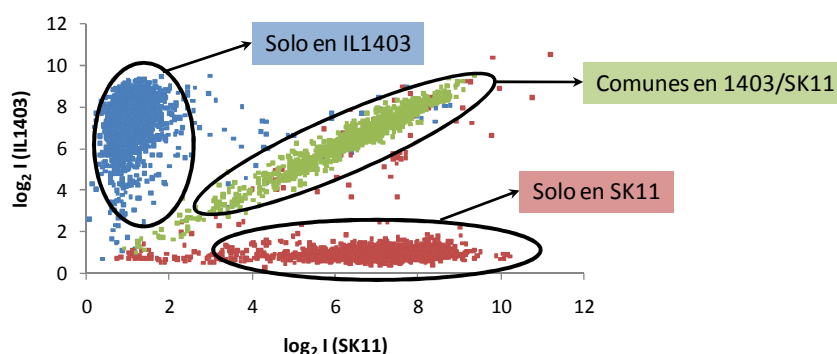
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Análisis del genoma de *L. lactis* IFPL730 por hibridación genómica comparativa (CGH)

Hasta este momento, un total de cuatro genomas de *L. lactis* han sido secuenciados y publicados. Dos de ellos pertenecen a cepas de laboratorio curadas de plásmidos (IL1403 y MG1363), sobre las que se han llevado a cabo la mayoría de estudios bioquímicos y genéticos de la especie (Bolotin *et al.*, 2001; Wegmann *et al.*, 2007). La tercera cepa (SK11) ha sido usada como cultivo iniciador para queso (Makarova *et al.*, 2006), y la cuarta (KF147) es una cepa de origen vegetal (Siezen *et al.*, 2010). El análisis comparativo de sus genomas evidenció una amplia diversidad genética intra e intersubespecie en *L. lactis*.

En este estudio, se ha investigado la organización del genoma de *L. lactis* IFPL730 mediante hibridación genómica comparativa (CGH) utilizando un microchip con los genomas de *L. lactis* IL1403 y *L. cremoris* SK11 que sirvieron para determinar diferencias en los patrones de expresión entre las estirpes. El microchip contenía sondas tanto para las regiones codificantes como para las regiones intergénicas y fue validado usando ADN genómico de IL1403 y SK11 (Fig. 4.1). Del total de regiones codificantes ($n = 4388$), un 20% correspondía a regiones comunes con $\geq 90\%$ de homología entre 1403 y SK11 y un 40% para cada grupo de genes únicos en cada estirpe control. Del total de regiones intergénicas ($n = 3319$), el 45% eran únicas en 1403 y el resto de SK11. La homología de estas regiones entre ambas cepas se situó cerca del 25%.

A) GENES



B) REGIONES INTERGÉNICAS

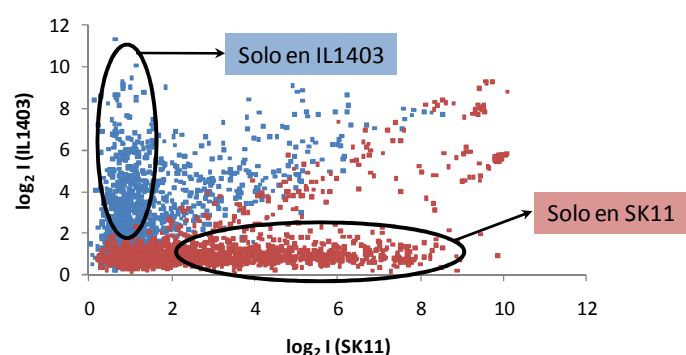


Figura. 4.1. Validación del microchip utilizado en el análisis genómico y transcriptómico, empleando ADN genómico de *L. lactis* IL1403 y *L. cremoris* SK11. Con diferente color se indican las regiones conservadas en cada estirpe, así como aquellas comunes con $\geq 90\%$ de homología. En cada eje se representan las intensidades normalizadas (\log_2) de los genes (A) o regiones intergénicas (B).

El análisis por CGH de las cepas IL1403, SK11 e IFPL730 por categorías funcionales está indicado en la Tabla 4.1. En la mayoría de las categorías, la cepa SK11 presenta el mayor número de genes. Entre las cepas IL1403 e IFPL730 existe un número de genes similar, aunque existen algunas diferencias. Por ejemplo, la cepa IFPL730 presenta el menor número de regiones codificantes relacionados con la biogénesis de membrana y pared celular, bacteriófagos, elementos de inserción y metabolismo en general. Si se desglosa esta última categoría se puede observar que IFPL730 presenta el mayor número de genes en relación al metabolismo de aminoácidos, al igual que SK11 en relación con el metabolismo de azúcares (Tabla 4.1.).

Tabla 4.1. Análisis de los genomas de *L. cremoris* SK11, *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* IFPL730 mediante hibridación genómica comparativa (CGH) por categorías funcionales^a.

CATEGORÍAS FUNCIONALES	SK11	IL1403	IFPL730
Almacenamiento y procesamiento de información	471	444	446
Traslación, estructura del ribosoma y biogénesis	159	167	168
Transcripción	192	171	167
Replicación, recombinación y reparación	120	106	111
Procesos celulares y señalización	335	341	319
Control del ciclo celular y división celular	19	19	17
Biogénesis y desarrollo de la membrana y pared celular	115	119	101
Movilidad celular	10	9	10
Modificación postraslacional	58	64	66
Señalización de la transducción	61	59	58
Secreción y transporte de sustancias	27	27	27
Mecanismos de defensa	45	44	40
Metabolismo	900	895	877
Producción de energía	76	84	79
Transporte y metabolismo de aminoácidos	219	220	225
Transporte y metabolismo de nucleótidos	86	93	90
Transporte y metabolismo de hidratos de carbono	196	174	169
Transporte y metabolismo de coenzimas	85	83	80
Transporte y metabolismo de lípidos	65	76	73
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	127	128	124
Transporte, biosíntesis y catabolismo de metabolitos 2 ^a	46	37	36
Genes poco o nada caracterizados	1146	1072	1020
Elementos de inserción	171	79	73
Fagos	187	232	126
Regiones intergénicas (IL1403)	440	1157	1026
Regiones intergénicas (SK11)	1315	407	431

^aLos valores representan el número de genes que participan en cada categoría funcional.

Con objeto de estudiar por CGH si las regiones codificantes e intergénicas estaban conservadas o eran divergentes en *L. lactis* IFPL730 se analizó la identidad de secuencia (IS), asumiendo la conservación del gen o región intergénica cuando $SI \geq -1,2$ ó $< 1,2$. Para ello, se analizaron tres grupos de regiones: las conservadas exclusivamente en IL1403 (grupo 1) y en SK11 (grupo 2) y los genes comunes con una homología $\geq 90\%$ en ambas estirpes (grupo 3).

- **Grupo 1: regiones únicas en IL1403** (Fig. 4.2 A, C). Se observó que un total de 1368 genes y 1351 regiones intergénicas estaban conservadas en IFPL730. Esto se tradujo en que el 80% del material único de IL1403 estaba conservado en IFPL730. Del conjunto de genes divergentes, un 33% correspondió a proteínas hipotéticas no caracterizadas, un 34% a bacteriófagos y el resto a genes relacionados con el

metabolismo del citrato (*cit CDEFR*), la biosíntesis de lipopolisacáridos (*yjeF*, *yohHJ*, *ycbFGJ*) y transporte y síntesis de ácido teicoico (*tag BFGHXYZ*).

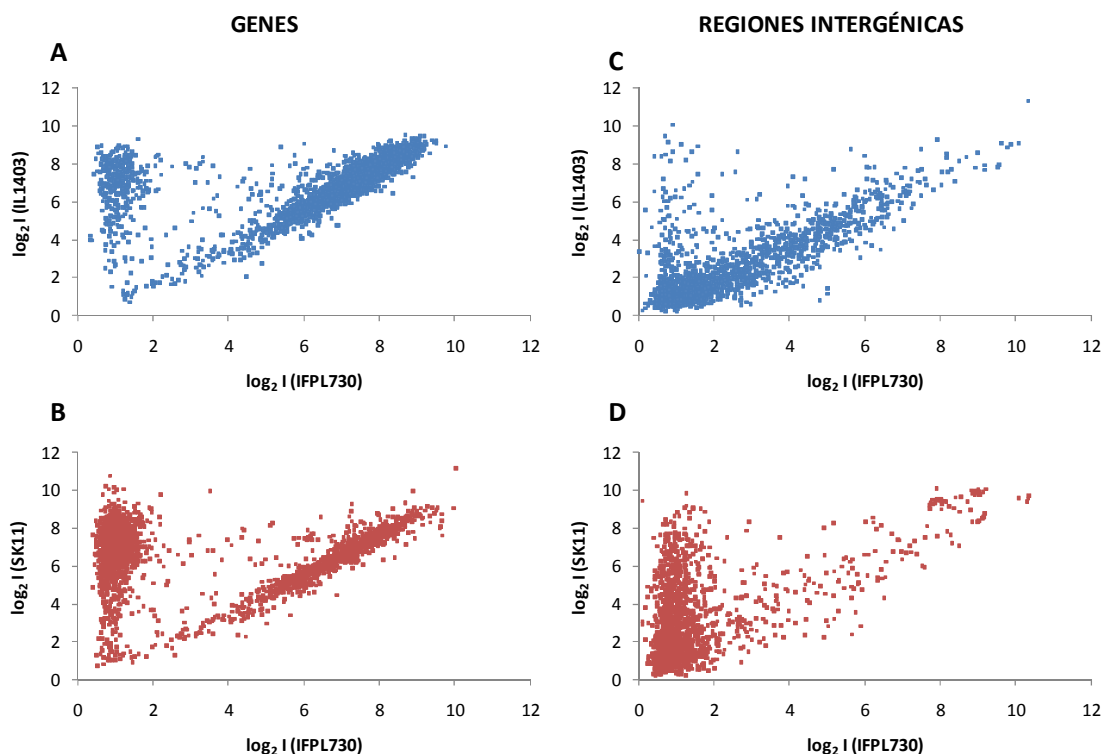


Figura 4.2. Representación gráfica de las intensidades (\log_2) de hibridación obtenidas para *L. lactis* IFPL730, comparándolas con las obtenidas para genes (A y B) y regiones intergénicas (C y D) únicos en *L. lactis* IL1403 (azul) y *L. cremoris* SK11 (rojo).

- **Grupo 2: regiones únicas en SK11** (Fig. 4.2 B, D). Solo 134 genes estaban conservados en IFPL730, mientras que el número de regiones intergénicas presentes ascendió a 1154. Esto representó cerca del 30% del material único de SK11 conservado en IFPL730. Del conjunto de genes conservados, un 14% correspondía a transposasas, un 10% a bacteriófagos, un 14% a proteínas hipotéticas y el resto a genes que codifican para proteínas de resistencia a antibióticos, D-lactato deshidrogenasa, proteínas de resistencia al frío y *riboswitches* (T-box, THI, RFN y SAM-S-box).

- **Grupo 3: genes comunes en IL1403 y SK11** (Fig. 4.3). El 98% de los genes comunes en ambas estirpes estaban conservados en *L. lactis* IFPL730. Los genes divergentes encontrados correspondían a proteínas hipotéticas, proteínas asociadas a fagos, transportadores de azúcares y reguladores de la familia Xre.

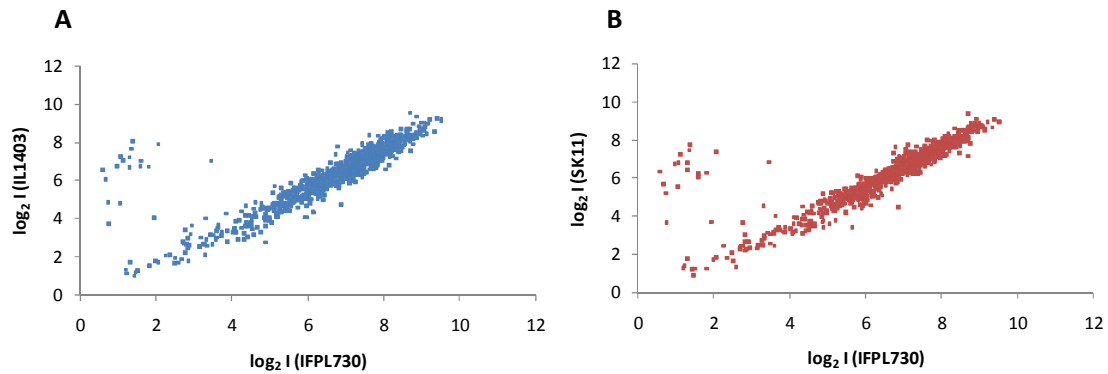


Figura 4.3. Representación gráfica de las intensidades (log₂) de hibridación obtenidas en *L. lactis* IFPL730 comparándolas con las obtenidas para genes comunes en *L. lactis* IL1403 (A) y *L. cremoris* SK11 (B).

El análisis por CGH mostró la variabilidad genética existente entre tres cepas de *L. lactis*, revelando la diversidad de genes y regiones intergénicas. Además, con el análisis de la identidad de secuencia se comprobó que el genoma de *L. lactis* IFPL730 está más próximo al de *L. lactis* IL1403 que al de *L. cremoris* SK11. No obstante, la presencia o ausencia de genes específicos en *L. lactis* IFPL730 no necesariamente se tendría que traducir en una expresión de diferentes fenotipos. Esta observación ha sido demostrada en varios trabajos. Bachmann *et al.* (2009) detectaron un alto grado de diversidad entre cepas muy cercanas de *L. lactis* mediante la regulación de los productos de genes específicos y no como consecuencia de una diferente dotación genética. De forma análoga, en estudios con *E. coli* y *Shigella* se observó que la diversidad fenotípica iba asociada no solo con una diversidad genética, sino también con cambios en la expresión de los genes (Le Gall *et al.*, 2005; Vijayendran *et al.*, 2007). Además, Tan-a-ram *et al.* (2011) han mostrado recientemente la diversidad a nivel de expresión génica entre varias cepas de *L. lactis* con una dotación genética similar.

4.3.2. Caracterización del crecimiento de *L. lactis* IL1403 y de *L. lactis* IFPL730 en presencia y ausencia de isoleucina en el medio de cultivo. Determinación del nivel de glucosa libre y la viabilidad de las células

El estrés ocasionado por la ausencia de isoleucina en el medio fue impuesto para *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* IFPL730 al inicio del crecimiento tras ser inoculados en CDM-Ile. La DO_{480} del cultivo de ambas cepas y los niveles de glucosa en el medio fueron determinados a lo largo de la curva de crecimiento tanto en CDM como en CDM-Ile (Fig. 4.4). Las dos cepas alcanzaron una menor densidad celular en ausencia de isoleucina que en CDM completo, al igual que una reducción significativa ($P < 0,05$) de la tasa de crecimiento máxima, indicando un estado de crecimiento limitado por la ausencia de isoleucina. La reducción de la tasa de crecimiento fue más acusada en IL1403 (Fig. 4.4), por lo que el crecimiento de esta cepa en ausencia de isoleucina fue más restringido.

La fuente de carbono que se utilizó en el medio de crecimiento fue glucosa a una concentración inicial de 5 g/L. Los niveles de glucosa residual alcanzaron valores por debajo del límite de detección (0,4 mg/L) del ensayo al cabo de 8 y 12 h de crecimiento de ambas cepas en CDM y CDM-Ile, respectivamente (Fig. 4.4). Esto indica que el agotamiento de glucosa en el cultivo dio lugar a la fase estacionaria temprana para ambas estirpes y para ambos medios. Presumiblemente el agotamiento de glucosa permitiría que las actividades metabólicas se ajustaran para hacer frente a la demanda anabólica y evitar así pérdidas de energía.

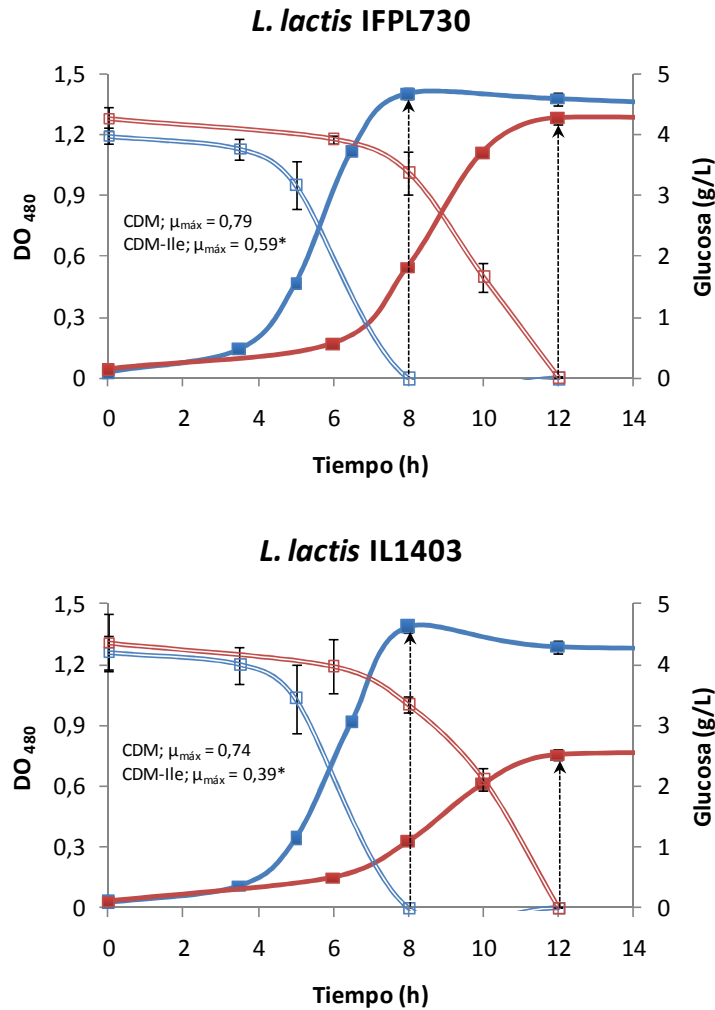


Figura 4.4. Curvas de crecimiento (líneas y símbolos rellenos) y niveles de glucosa (líneas y símbolos sin relleno) para *L. lactis* IFPL730 y *L. lactis* IL1403 en CDM (color azul) y CDM-Ile (color rojo). Las diferencias significativas con una $P < 0,05$ aparecen representadas con un asterisco. Las flechas indican el agotamiento de la glucosa coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria.

Adicionalmente, se realizaron recuentos en placa para evaluar el crecimiento de cada cepa durante las condiciones de estudio. *L. lactis* IFPL730 e IL1403 alcanzaron el número máximo de recuentos con $\sim 10^9$ UFC (unidades formadoras de colonias)/mL durante las 8-10 primeras horas de crecimiento, excepto para IL1403 en CDM-Ile que alcanzó un valor máximo de $6,2 \times 10^8$ UFC/mL a las 12 h de cultivo. Asimismo, *L. lactis* IL1403 alcanzó en CDM el estado no cultivable (NC), es decir, en el que ninguna colonia apareció en las placas de recuentos, situación que se dio a los 30 días de incubación (Fig. 4.5). Con el kit de viabilidad BacLight Live-Dead (Invitrogen) se comprobó, sin embargo, que las células en este estado NC estaban todavía viables (Fig. 4.5), lo que

concuera con lo observado por Ganesan *et al.*(2007) e Yvon *et al.* (2010). Estos autores observaron un porcentaje elevado de células viables tras una incubación prolongada pero en el estado NC, en donde las células, al permanecer con sus paredes intactas, permitían el transporte de péptidos y aminoácidos y su posterior catabolismo hasta compuestos volátiles. Asimismo, se ha descrito que *L. lactis* es capaz de sobrevivir en medios mínimos sin la adición de una fuente de energía externa durante semanas (Stuart *et al.*, 1999), e incluso es capaz de extender este tipo de supervivencia durante años (Ganesan *et al.*, 2007).

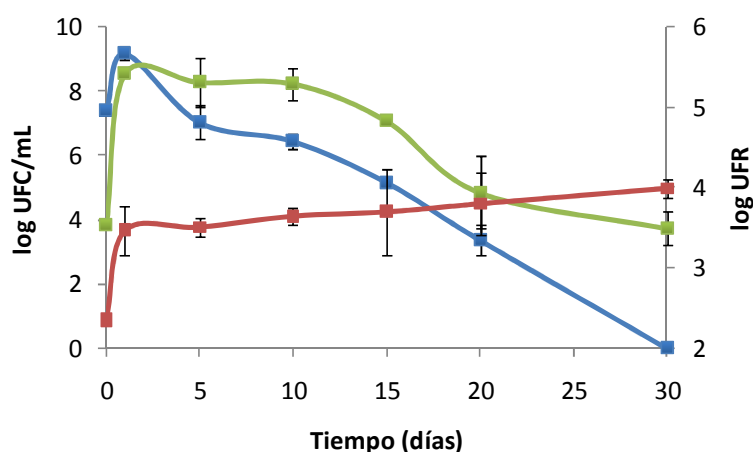


Figura 4.5. Recuentos en placa (línea azul) y valores de células viables (línea verde) y no viables (línea roja) de *L. lactis* IL1403 durante la incubación a 30 °C en CDM. UFC, unidad formadora de colonias; UFR, unidad de fluorescencia relativa.

Aunque *L. lactis* IL1403 se había descrito como auxotrófico para isoleucina (Godon *et al.*, 1993; Cocaigh-Busquet *et al.*, 1995), en este estudio se muestra que esta cepa pudo sostener un crecimiento constante en ausencia de isoleucina, aunque presentó una tasa de crecimiento más baja que *L. lactis* IFPL730. Por lo tanto, la ruta de biosíntesis de isoleucina en *L. lactis* IL1403 parece ser suficientemente funcional aunque manteniendo una actividad limitada. Godon *et al.* (1993) consideraron que *L. lactis* era auxotrófico para un aminoácido determinado cuando no se obtenía ninguna colonia tras 24 h de incubación en un medio sólido en ausencia de ese aminoácido. No obstante, estos autores observaron la formación de pequeñas colonias de *L. lactis* IL1403 después de 3 días de incubación en el medio sin isoleucina. Esas observaciones

podrían ajustarse a los resultados encontrados en este estudio, ya que a los 5 días de crecimiento en CDM-Ile *L. lactis* IL1403 todavía mantenía valores de 10^7 UFC/mL (resultados no mostrados).

4.3.3. Caracterización de la respuesta de *L. lactis* a la ausencia de isoleucina o glucosa sobre el metabolismo de aminoácidos mediante un estudio transcriptómico con microchips

Con objeto de caracterizar el efecto de la ausencia de isoleucina en el medio de crecimiento sobre el metabolismo de aminoácidos en *L. lactis*, se llevó a cabo un estudio transcriptómico que fue desarrollado en tres etapas de la curva de crecimiento: inicio del crecimiento (T0), fase exponencial (T1) y fase estacionaria temprana (T2). Para ello, se comparó la expresión génica de *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* IFPL730 crecidos en un medio de crecimiento químicamente definido sin isoleucina (CDM-Ile) con el mismo medio completo (CDM), usado como control para establecer las diferencias en expresión (LRs). Adicionalmente, en *L. lactis* IL403 se comparó la expresión en otras dos etapas de la fase de crecimiento, tras el agotamiento de azúcar en el cultivo (SE) y en el estado no cultivable (NC).

El estudio se centró en la investigación de la expresión de genes anotados en el genoma de *L. lactis* para el metabolismo de aminoácidos, incluyendo la hidrólisis de péptidos y el transporte de péptidos y aminoácidos, la síntesis de aminoácidos relacionada con el suministro intracelular de isoleucina, además de los posibles elementos regulatorios. La ausencia de isoleucina no generó cambios globales en rutas metabólicas específicas, es decir, que no todos los genes que generaron cambios significativos ($q \leq 0,25$) estaban asociados en la misma ruta metabólica.

4.3.3.1. Expresión de genes relacionados con la hidrólisis de péptidos y transporte de péptidos y aminoácidos

La expresión génica de transportadores de péptidos y aminoácidos, proteasas y aminopeptidasas es mostrada en la figura 4.6. Además se incluyeron por extensión los resultados correspondientes a aquellos genes anotados como posibles transportadores y los que codifican para permeasas (Bolotin *et al.*, 2001).

El sistema *opp*, responsable del transporte de péptidos, permaneció completamente activo durante todo el crecimiento en ambas cepas, destacando la inducción (LR = 2,22) de *oppA* durante la fase exponencial (T1) en *L. lactis* IFPL730 crecido en CDM-Ile. Este resultado reflejaría una regulación positiva del gen mediada por la anulación del efecto represor de CodY ante la ausencia de isoleucina en el medio de cultivo (Guédon *et al.*, 2005). Recientemente, Yvon *et al.* (2010) también observaron la inducción de *oppA* en *L. lactis* cuando en el medio de crecimiento existía una fuerte limitación en el contenido de aminoácidos, especialmente isoleucina. Mientras que en las primeras horas de crecimiento el sistema *opp* podría ser el principal sistema de transporte de péptidos, una vez que el azúcar se agotó en el medio de crecimiento, no se apreciaron cambios en su expresión, a pesar de que *oppC* aumentó significativamente la expresión (LR = 1,99) en el estado no cultivable (NC). Este resultado podría sugerir que algunos pequeños péptidos podrían ser transportados durante el estado NC.

En relación al sistema *opt*, también relacionado con el transporte de péptidos, *optB* y *optF* fueron los únicos genes que manifestaron cambios significativos ($q \leq 0,25$) durante la fase exponencial de crecimiento en ambas cepas. Esos cambios responderían a los requerimientos celulares para optimizar la asimilación de nitrógeno. Una regulación positiva de genes implicados en la hidrólisis y el transporte de péptidos en respuesta a la ausencia de isoleucina favorecería la asimilación de péptidos (extra o intracelulares) y, por lo tanto, incrementaría el suministro de isoleucina (Lamarque *et al.*, 2004).

Por otro lado, la mayoría de genes del sistema *pep*, que codifican para aminopeptidasas (AP), fueron reprimidos durante la fase exponencial. A pesar de ello,

algunos genes mantuvieron una expresión alta en ambas cepas, como *pepA*, *pepN* y *pepO*. La expresión del sistema *pep* estaría afectada por la acción de CodY, pero la represión de los genes también ocurrió cuando las cepas fueron crecidas en ausencia de isoleucina. Probablemente otro BCAA como la valina estaría implicado en la inducción de CodY, tal y como observaron Villapakkam *et al.* (2009) en *B. subtilis*. Por otro lado, se observó que dos genes del sistema *pep* en IL1403 estaban inducidos de forma significativa en el estado NC, *pepDB* y *pepM*. El aumento de expresión (LR = 2,20) del gen que codifica para la aminopeptidasa específica de metionina (*pepM*) en *L. lactis* IL1403 sugiere que este aminoácido podría tener una importante función en dicho estado celular.

Respecto a los genes que codifican para otros transportadores y permeasas, se observó una gran variabilidad en su expresión en *L. lactis*, tanto si se comparan las cepas entre sí como si se compara entre los medios de crecimiento, como puede observarse en la figura 4.6. La presencia o ausencia de isoleucina provocó más cambios en la expresión en IL1403, lo que indicaría que esta estirpe estaría sometida a una mayor regulación por este aminoácido que IFPL730. En general, se observaron varios patrones de expresión en este tipo de genes: (i) la ausencia de isoleucina afectó a la expresión sólo en IL1403, como en los genes *dtpT* y *ctrA*; (ii) aumentó la expresión en ambas cepas cuando crecieron en CDM, como en los genes *yagE*, *ydcF* y *ydgB*, lo que podría sugerir la implicación de estas permeasas en el transporte de isoleucina al interior celular; (iii) aumentó la expresión en CDM-Ile en IL1403 y/o en IFPL730, como en los genes *yhcA*, *yijC*, *ylcA*, *yshA* y *yxdG*, pudiendo estar asociada su expresión a un cese en la represión de CodY; y (iv) tras el consumo de glucosa se mantuvo la expresión de la mayoría de genes a un nivel basal, aunque se detectaron cambios significativos en genes como *ctrA*, *dtpT*, *yagE*, *ycheE*, *ydgB*, *yjgE*, *ysaC*, *yshA* y *yxdG*.

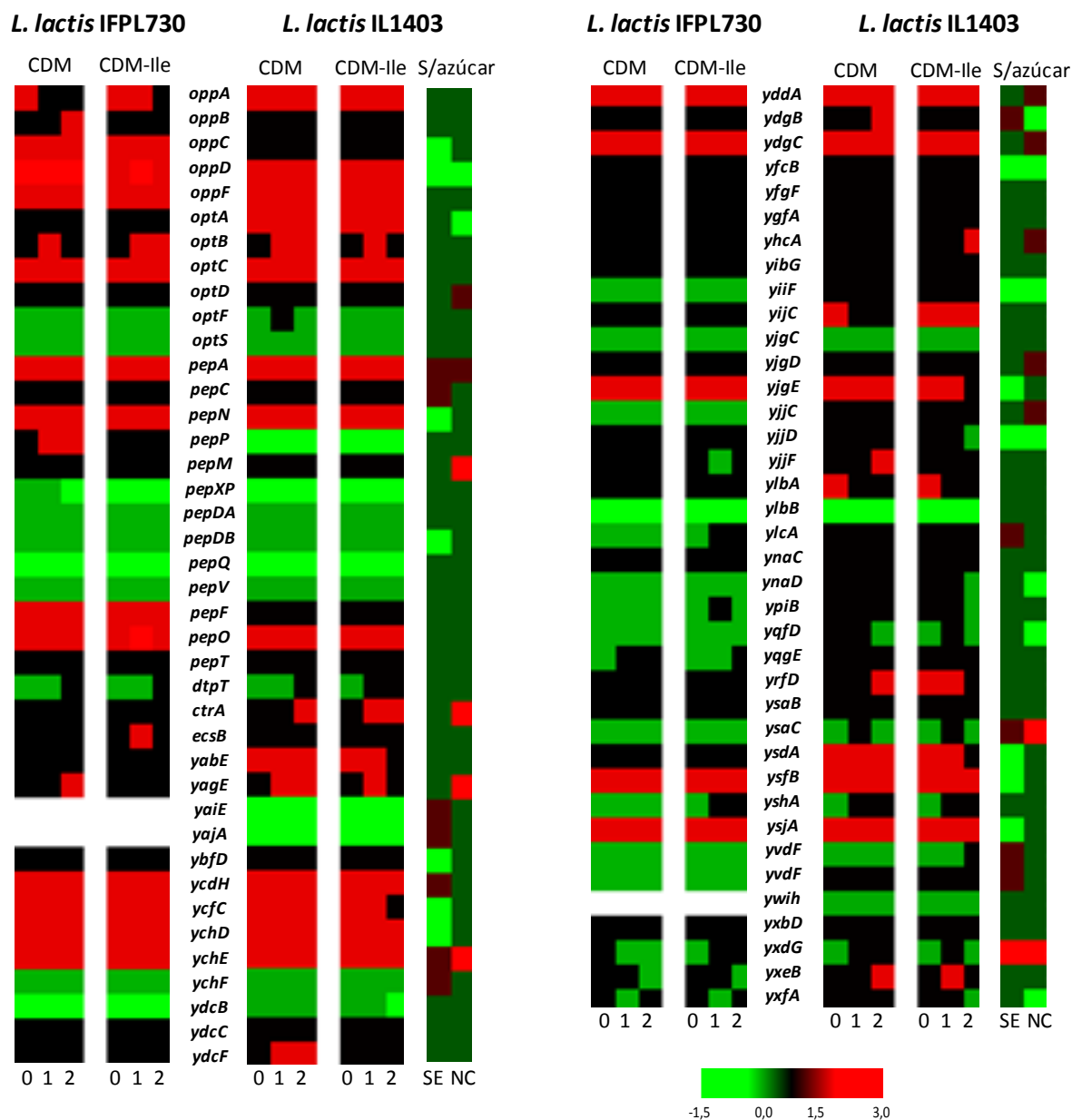


Figura 4.6. Mapas de expresión de genes relacionados con la hidrólisis de péptidos y el transporte de péptidos y aminoácidos en *L. lactis* IFPL730 y *L. lactis* IL1403 crecidos en CDM y CDM-Ile. Las diferencias de colores responden a cambios significativos ($q \leq 0,25$) en la expresión según la escala anexa. Claves: 0, inicio del crecimiento; 1, fase exponencial; 2, fase estacionaria temprana; SE, agotamiento de azúcar; NC, estado no cultivable.

4.3.3.2. Expresión de genes en *L. lactis* relacionados con la biosíntesis de isoleucina y otros aminoácidos

Dado que las estirpes de *L. lactis* utilizadas en este estudio fueron capaces de crecer en ausencia de isoleucina en CDM-Ile, investigamos la expresión de la ruta de

biosíntesis de este aminoácido. Los resultados obtenidos mostraron que la respuesta de *L. lactis* (IFPL730 e II1403) a la ausencia de isoleucina no sólo se limitó a la estimulación de dicha ruta de biosíntesis, sino que provocó una reorganización en las rutas del metabolismo de otros aminoácidos. Algunas de las adaptaciones metabólicas estarían conectadas con el metabolismo del carbono, dedicado a incrementar la producción de isoleucina en detrimento de la producción de energía y estimulación del crecimiento (Dressaire *et al.*, 2008).

Se han descrito diferentes precursores alternativos para la biosíntesis de isoleucina en microorganismos y plantas como glutamato, 2-metilbutirato, metionina, propionato, homolantionina y citramalato (Phillips *et al.*, 1972; Kisumi *et al.*, 1977; Monticello *et al.*, 1984; Hochuli *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2004; Krömer *et al.*, 2006; Risso *et al.*, 2008; Joshi y Jander, 2009). En *L. lactis*, la síntesis de isoleucina se produce de forma general por el principal precursor α -cetobutirato (2-oxobutanoato) (Godon *et al.*, 1992). Este precursor conecta el metabolismo del ácido aspártico, de la treonina y de la metionina. Por ello, nuestro objetivo fue comparar las diferencias en expresión en la ruta de biosíntesis de la isoleucina considerando al α -cetobutirato como el precursor clave (Figs. 4.7 y 4.8).

El medio químicamente definido usado para el crecimiento de *L. lactis* utilizado en este estudio no contenía ácido aspártico en su composición, por lo que las células probablemente lo generan a partir de oxalacetato, un intermediario del ciclo TCA (ácidos tricarboxílicos), por una reacción de transaminación con glutamato. La expresión de los genes que codifican para estas aminotransferasas, *aspB* y *aspC*, se mantuvieron por encima del nivel basal en todos los casos. El ácido aspártico es también precursor de la biosíntesis de otros aminoácidos como lisina, treonina y metionina, enlazando el metabolismo de aminoácidos y del carbono. De hecho, en ausencia de azúcar la expresión de estos genes se vio reducida, siendo la reducción más acusada para *aspC* (LR = -2,50).

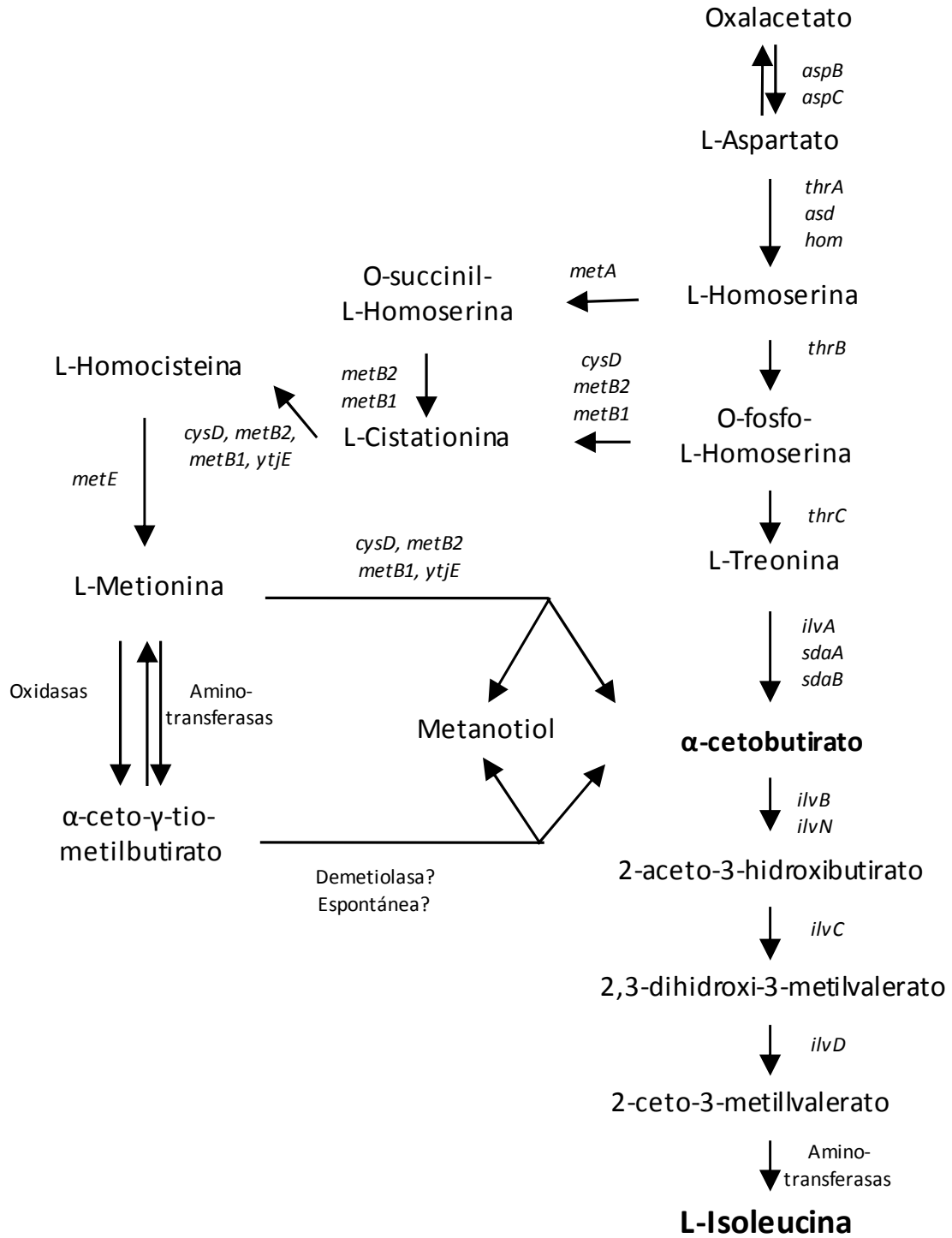


Figura 4.7. Ruta de biosíntesis de isoleucina interconectada con las rutas metabólicas de otros aminoácidos como ácido aspártico, treonina y metionina. Los genes que codifican las enzimas que catalizan cada reacción están anotados en cursiva.

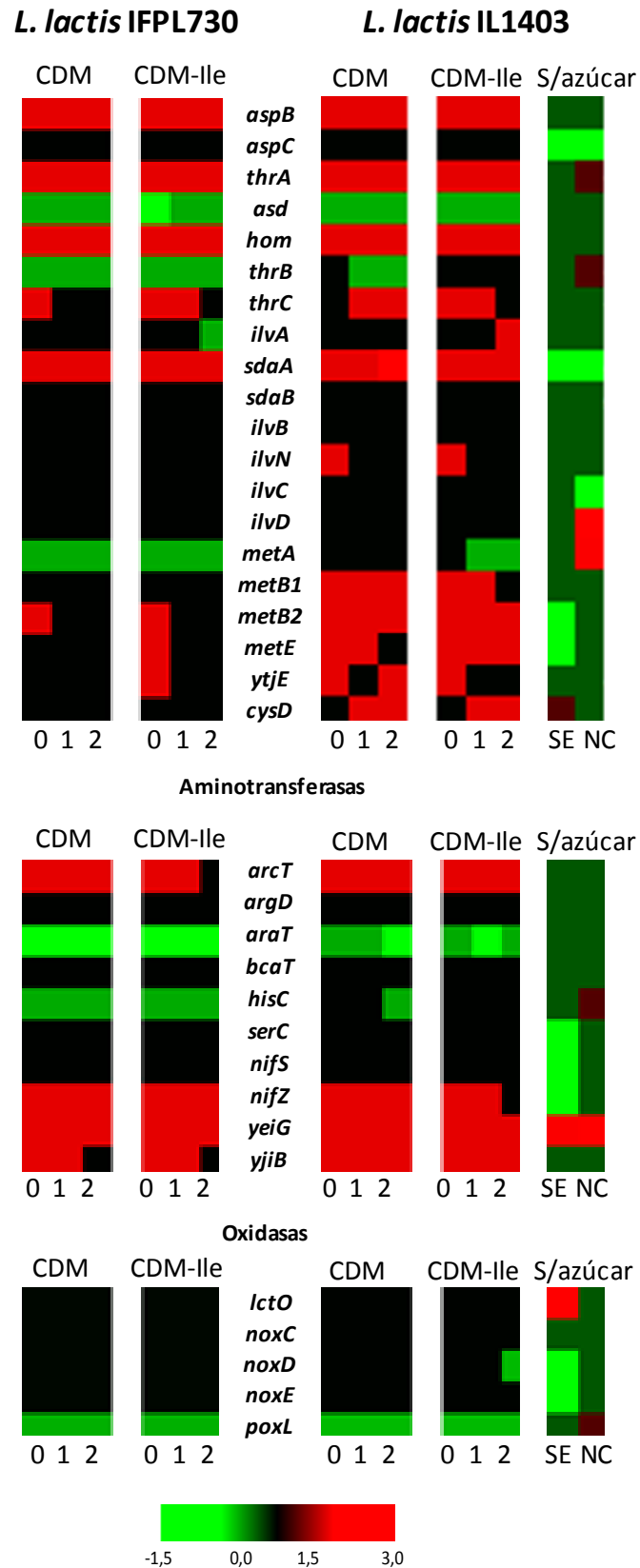


Figura 4.8. Mapas de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de isoleucina (Fig.4.7) en *L. lactis* IFPL730 y *L. lactis* IL1403 crecidos en CDM y CDM-Ile. Las diferencias de colores responden a cambios significativos ($q \leq 0,25$) en la expresión según la escala anexa. Claves: 0, inicio del crecimiento; 1, fase exponencial; 2, fase estacionaria temprana; SE, agotamiento de azúcar; NC, estado no cultivable.

Además de ser aportada en el medio de crecimiento, la treonina puede ser generada a partir de aspartato vía homoserina en varios pasos catalizados por una aspartato kinasa (ThrA), dos dehidrogenasas (Asd y Hom), una homoserina kinasa (ThrB) y una treonina sintasa (ThrC) (Fig. 4.7.). Los niveles de expresión para estos genes fueron, respecto del nivel basal, más altos para *thrA* y *hom* y algo bajos para *asd*, aunque ninguna diferencia significativa fue encontrada entre CDM y CDM-Ile. Sin embargo, la expresión de *thrB* aumentó ($LR \geq 1,60$) de forma significativa ($q \leq 0,25$) en *L. lactis* IL1403 crecido en CDM-Ile durante la fase exponencial de crecimiento, mientras que la expresión se mantuvo constante en ambos medios para *L. lactis* IFPL730. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en la expresión de *thrC* entre los crecimientos en CDM y CDM-Ile en ambas cepas, aunque una potencial regulación de este gen por isoleucina fue más obvia en IFPL730, donde el LR fue de 2,17 en la primera fase de crecimiento.

La conversión de treonina a isoleucina en *L. lactis* es llevada a cabo por varias enzimas, cuyos genes codificantes (*ilvA*, *ilvB*, *ilvN*, *ilvC*, *ilvD*) mostraron cambios en la expresión durante los crecimientos en CDM y CDM-Ile, aunque solo se detectaron diferencias significativas en *L. lactis* IFPL730. La mayoría de los cambios producidos quedaron por debajo de los niveles mínimos configurados en los mapas de expresión, y es por ello que no generaron cambios en el color (Fig. 4.8). De ahí, que se muestren los LR en la tabla 4.2., observándose que estos genes aumentaron ligeramente su expresión en IFPL730 cuando fue crecido en CDM-Ile, excepto para *ilvA*, durante la fase exponencial de crecimiento. El gen *ilvA* presentó en CDM-Ile una expresión desigual según la cepa. Mientras que en IL1403 el gen se inducía (aunque no de manera significativa), en IFPL730 el gen fue reprimido (Tabla 4.2). A priori, este resultado podría suponer una contradicción en IFPL730, a menos que hubiera diferencias en la secuencia del gen *ilvA* entre las dos estirpes que pudieran explicar las diferencias de expresión. Para corroborar esta hipótesis, se analizó por CGH a nivel de sonda tanto la secuencia del gen *ilvA* como la de su región anterior. Este análisis consistió en compararla intensidad de hibridación obtenida en *L. lactis* IL1403 y *L. lactis* IFPL730 para cada una de las sondas insertadas en la matriz del microarray que conforman el gen *ilvA* y su región anterior. Se observaron diferencias en la hibridación de la sonda 2

del gen *ilvA* en IFPL730 (Fig. 4.9A), indicando una divergencia parcial de este gen entre las dos estirpes. Además, la región intergénica más próxima al gen también parece diferente entre las dos cepas (sondas 2 y 3 en IFPL730) (Fig. 4.9B), lo que se sugiere que *ilvA* en IFPL730 podría tener un tipo de regulación diferente a la existente en IL1403.

Tabla 4.2. Diferencias en expresión (LRs^a) encontradas en genes de la familia *ilv* en *L. lactis* IFPL730 y *L. lactis* IL1403 durante su cultivo en ausencia (CDM-Ile) y presencia de isoleucina (CDM) en distintas etapas del crecimiento (T0, inicio; T1, fase exponencial; T2, fase estacionaria).

Genes	<i>L. lactis</i> IFPL730				<i>L. lactis</i> IL1403			
	T0	T1	T2	Valor q^b	T0	T1	T2	Valor q^b
<i>ilvA</i>	1,07	1,34	-1,95	0,07	-0,07	0,05	1,92	0,43
<i>ilvB</i>	1,20	1,16	1,04	0,19	-0,06	0,08	0,03	0,79
<i>ilvN</i>	1,01	1,17	1,27	0,17	0,04	0,11	0,19	0,80
<i>ilvC</i>	1,08	1,25	1,26	0,16	-0,03	-0,05	0,03	0,50
<i>ilvD</i>	1,03	1,03	1,10	0,15	0,14	0,11	0,09	0,51

^a LRs calculados a partir de la diferencia en intensidades (log2) obtenidas por cada gen durante el crecimiento de las estirpes en CDM-Ile con respecto al crecimiento en CDM. Valores positivos y negativos indican inducción en CDM-Ile y CDM, respectivamente.

^b valor q calculado teniendo en cuenta dos variables, tratamiento (CDM/CDM-Ile) y tiempo (T0, T1 y T2). Los valores significativos se consideraron a partir de $q \leq 0,25$.

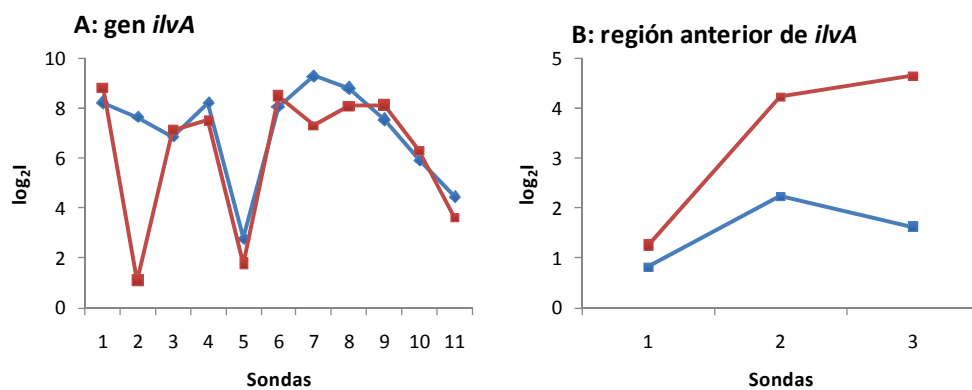


Figura 4.9. Análisis por CGH del gen *ilvA* (A) y de su región intergénica anterior (B) a nivel de sonda. Cada punto representa la intensidad de hibridación obtenida en *L. lactis* IL1403 (color azul) y *L. lactis* IFPL730 (color roja) para cada una de las sondas que conforman el gen *ilvA* y su región anterior en el chip utilizado.

Por otro lado, la represión de *ilvA* en *L. lactis* IFPL730 al crecer en CDM-Ile debería ser compensada por la actividad de otra enzima que garantizara la degradación de treonina hacia la formación de isoleucina. Buscando en el genoma de IL1403 (Bolotin *et al.*, 2001) y en la base de datos BIOCYC (<http://biocyc.org>) encontramos por analogía en su función que las enzimas SdaA y SdaB (serina deaminasas) serían candidatas para iniciar la degradación de treonina. De hecho, los genes que codifican para estas enzimas, *sdaA* y *sdaB*, presentaron una elevada expresión con independencia del medio de crecimiento en IFPL730.

La inducción del grupo de genes *ilv* (excepto *ilvA*) en IFPL730 durante el crecimiento en CDM-Ile coincide con las observaciones encontradas recientemente en *E. coli* al crecer en ausencia de isoleucina (Traxler *et al.*, 2008), donde los genes que participan en la degradación de treonina hacia la formación de isoleucina fueron regulados positivamente. Nuestros resultados indicaron que la regulación efectuada por el nivel de isoleucina estaba mediada por CodY. La ausencia de isoleucina en el medio de crecimiento reduciría los niveles de BCAAs desbloqueando la represión de CodY, haciendo posible la regulación positiva observada en IFPL730. Además, el regulador CcpA podría también estar implicado, en tanto que la glucosa estuvo presente durante la fase exponencial (Fig. 4.4). Algunos estudios han mostrado en *B. subtilis* la inducción de los genes *ilv* por la presencia de glucosa en un mecanismo dependiente de CcpA, así como la represión de esos genes por CodY, excepto *ilvA* (Ludwing *et al.*, 2002; Shivers y Sonenshein, 2005; Tojo *et al.*, 2005). Por lo tanto, en presencia de glucosa, CcpA podría estar regulando sus propios genes diana, además de aquellos genes regulados por CodY.

Adicionalmente, la ruta de biosíntesis de isoleucina puede relacionarse con el metabolismo de los aminoácidos azufrados en tanto que la conversión de metionina y, probablemente, otros compuestos azufrados produce α -cetobutirato (Fig.4.7), un precursor de la síntesis de isoleucina. La metionina es un aminoácido esencial requerido para un número importante de funciones celulares (síntesis de proteínas, metilación del ADN, etc.), por lo que las células tienen que sintetizarla, aun estando presente en el medio de crecimiento (Soda, 1987). *L. lactis* puede sintetizar metionina vía homoserina u homocisteína (Martínez-Cuesta *et al.*, 2011) (Fig. 4.7), implicando a

varias enzimas codificadas por los genes *metA*, *metB1*, *metB2* y *metE*. A diferencia de lo observado en *metA*, todos esos genes fueron regulados positivamente en *L. lactis* 1403 crecido tanto en CDM como en CDM-Ile.

De acuerdo con la Fig. 4.7, la conversión de metionina a α -cetobutirato puede ser llevada a cabo de dos formas: (i) a través de una reacción que implique la participación de una enzima liasa, y (ii) a través de una reacción de transaminación vía α -ceto- γ -tiometilbutirato. Ninguna aminotransferasa de las 12 anotadas en el genoma de *L. lactis* IL1403 ha sido descrita como específica de metionina, por lo que cualquier aminotransferasa (EC. 2.6.1.42) podría catalizar la reacción. De los genes propuestos en la fig. 4.7 para codificar aminotransferasas, tan solo dos experimentaron una inducción cuando las células fueron crecidas en CDM-Ile durante el inicio de la fase estacionaria (T2), *hisC* en IL1403 (LR = 1,95) y *bcaT* (LR = 1,34) en IFPL730 e IL1403. Tanto estas dos aminotransferasas como otras que mantuvieron un nivel alto de expresión (*nifZ*, *yeiG*, *yjiB* o *oarcT*) pudieron actuar en la transaminación de metionina. Se ha descrito que BcaT es una aminotransferasa activa en *L. lactis* frente a metionina (Rijnen *et al.* 2003).

Por otro lado, aunque en un principio se sugirió que el producto de *ytjE* era específico para la transaminación de metionina (Bolotin *et al.* 2001), Martínez-Cuesta *et al.* (2006) demostraron la actividad α,γ -liasa de YtjE frente a metionina. La expresión de *ytjE* en *L. lactis* fue más alta que el nivel basal de expresión general (nivel medio de expresión de todos los genes estudiados) y se encontraron cambios significativos ($q \leq 0,25$) al comparar los crecimientos en CDM y CDM-Ile en ambas cepas.

Cuando se estudió la expresión génica de *L. lactis* IL1403 en estados celulares tras el consumo de la fuente de carbono, se encontraron cambios significativos en algunos genes. Mientras que en el estado SE (agotamiento de glucosa) casi todos los genes fueron reprimidos, en el estado NC (estado no cultivable) algunos genes recuperaron una expresión constante y otros la aumentaron, como *thrA* y *thrB* (LR = 2,10), *ilvD* (LR = 2,92), *metA* (LR = 2,85), *metB2* y *metE* (LR = 1,65). A pesar de estos cambios, la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de isoleucina en estos estados celulares fue marcadamente más baja que los obtenidos en la fase exponencial de crecimiento.

4.3.3.3. Expresión de genes relacionados con los mecanismos de regulación globales

Para optimizar el crecimiento, las bacterias no solo tienen que detectar la disponibilidad de un determinado tipo de nutriente (p. ej. carbono), sino que también tienen que ajustar la ingesta o producción de otro tipo de nutrientes (p. ej. nitrógeno, fósforo y azufre). En *L. lactis*, la expresión de varios grupos de genes relacionados con estos nutrientes está definida por reguladores transcripcionales globales (Guédon *et al.*, 2001). El factor transcripcional CcpA está relacionado con la respuesta ante la disponibilidad de carbono y energía. En este estudio, la expresión de *ccpA* fue constante mientras el azúcar estuvo presente en los medios de crecimiento con independencia de la presencia o ausencia de isoleucina (Fig. 4.10). Sin embargo, se observó inducción del gen *ccpA* en IL1403 en el estado no cultivable (LR = 2,54). Esta inducción también había sido observada por Ganesan *et al.* (2007) cuando caracterizaron la expresión de genes en *L. lactis* IL1403 en estados celulares tras el agotamiento de la fuente de carbono.

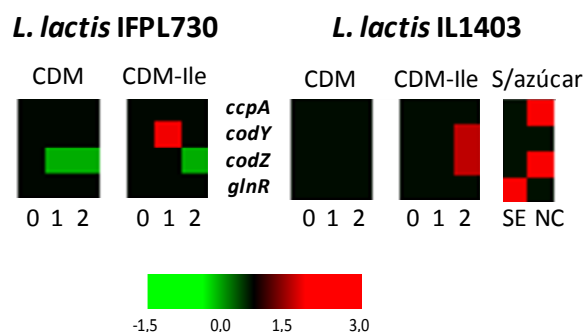


Figura 4.10. Mapas de expresión de genes relacionados con reguladores globales del metabolismo en *L. lactis* IFPL730 y *L. lactis* IL1403 crecidos en CDM y CDM-Ile. Las diferencias de colores responden a cambios significativos ($q \leq 0,25$) en la expresión según la escala anexa. Claves: 0, inicio del crecimiento; 1, fase exponencial; 2, fase estacionaria temprana; SE, agotamiento de azúcar; NC, estado no cultivable.

El regulador GlnR ha sido descrito como controlador del metabolismo del nitrógeno en *L. lactis* (Larsen *et al.*, 2006). La expresión de *glnR* por *L. lactis* IFPL730 e IL1403 se mantuvo constante en todos los casos, excepto en el estado SE, por lo que se

podría asumir que este regulador no estaría implicado en la respuesta a la ausencia de isoleucina.

El cúmulo intracelular de BCAAs, especialmente de isoleucina, actúa como un sensor de la disponibilidad de aminoácidos vía CodY (Guédon *et al.*, 2001a). Además de *codY*, *L. lactis* contiene un segundo gen, *codZ*, que codifica para una proteína homóloga a CodY (Bolotin *et al.*, 2001). El gen *codZ* no está presente en *B. subtilis* y aunque su papel en *L. lactis* es todavía desconocido, fue incluido en el estudio transcriptómico. Durante la fase exponencial de crecimiento de *L. lactis*, no se detectaron cambios significativos ($q \leq 0,25$) en la expresión de *codY* y *codZ* en respuesta al crecimiento en CDM/CDM-Ile, aunque sí se encontraron diferencias por cepa. Mientras que para *codY* el patrón de expresión fue similar, la expresión de *codZ* fue antagónica, puesto que a diferencia de IL1403, en IFPL730 el gen fue reprimido en la fase estacionaria, con independencia de la presencia o ausencia de isoleucina. Para explicar las diferencias en expresión entre cepas, se analizaron por CGH a nivel de sonda los genes *codY* y *codZ* y sus regiones anteriores (Fig.4.11). En ambas cepas *codY* fue muy similar, aunque se observó una ligera diferencia en la región anterior de IFPL730. Por otro lado, mientras que la primera parte del gen *codZ* es divergente en IFPL730, su región anterior está prácticamente conservada en ambas estirpes.

Las diferencias entre *L. lactis* IFPL730 e IL1403 encontradas por CGH para los genes *codY* y *codZ* y sus regiones intergénicas anteriores responderían a las diferencias en la expresión tanto de esos genes como a las de sus genes diana. La diversidad en los mecanismos de regulación por CodY entre cepas de *L. lactis* fue observada por Bachmann *et al.* (2009), a pesar de que los sitios de unión a CodY están muy conservados en este género (Guédon *et al.*, 2005).

Los resultados de expresión de los genes implicados en la regulación global del metabolismo de *L. lactis* indicaron que tanto el metabolismo del nitrógeno como el del carbono estuvieron bajo una regulación activa durante la fase exponencial de crecimiento y en la etapa de ausencia de fuente de carbono.

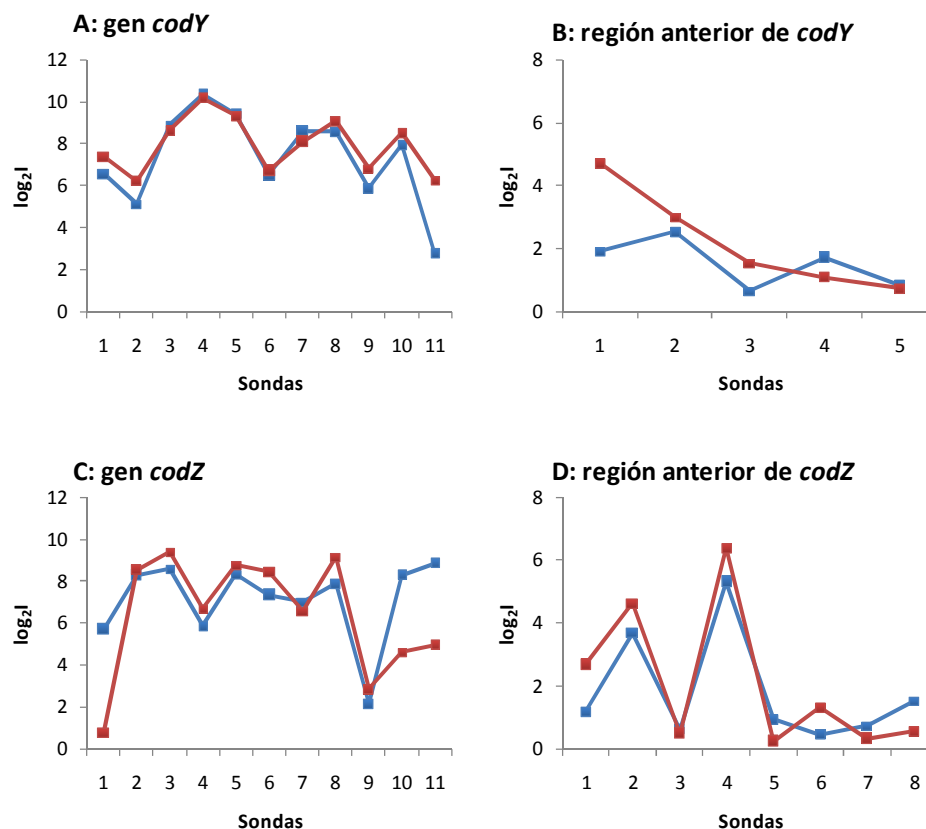


Figura 4.11. Análisis por CGH de los genes *codY* y *codZ* (A y C) y de sus regiones intergénicas anteriores (B y D) a nivel de sonda. Cada punto representa la intensidad obtenida en *L. lactis* IL1403 (color azul) y *L. lactis* IFPL730 (color roja) para cada una de las sondas que conforman esos genes y sus regiones anteriores en el chip utilizado.

4.4. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO

La combinación de los análisis transcriptómico y genómico, asociados con el estudio fenotípico de crecimiento, ha hecho posible hacer una descripción de la respuesta de *L. lactis* a la falta de isoleucina y azúcar en el medio de crecimiento, ampliando el conocimiento del metabolismo de esta bacteria, sobre todo a nivel de cepa, donde hemos podido comprobar a través del análisis por CGH de *L. lactis* IL1403, *L. cremoris* SK11 y *L. lactis* IFPL730 que en *L. lactis* existe una gran variabilidad interespecífica.

Se ha mostrado la respuesta transcriptómica de dos cepas de *L. lactis* (IL1403 e IFPL730) a la carencia de isoleucina sobre ciertas rutas del metabolismo de

aminoácidos. Se ha observado una diversa regulación en la expresión de genes implicados en la hidrólisis de péptidos y el transporte de péptidos y aminoácidos en respuesta a la ausencia de isoleucina. También se ha estudiado la diferente expresión de genes involucrados en la biosíntesis de isoleucina en las dos estirpes y en diferentes estados celulares. En ausencia de isoleucina en el medio, probablemente la ruta aspartato-treonina es la principal responsable para el aporte de isoleucina en *L. lactis*, aunque otras rutas pudieran estar participando *in vivo*, como la ruta de biosíntesis de metionina en IL1403. Por esta razón, nuevos estudios serían necesarios para determinar la proporción de isoleucina producida a partir de cada una de estas rutas.

Por último, se ha observado que existe un mecanismo complejo de regulación participando en la respuesta de *L. lactis* frente a la carencia de isoleucina, implicando a varios reguladores y conectando el metabolismo del nitrógeno y del carbono. La ausencia de isoleucina provoca en primer lugar una reducción de la actividad fisiológica (probablemente mediada por CcpA) dado que el crecimiento se ralentiza. En segundo lugar, la falta de isoleucina provoca la ausencia de la actividad represora de CodY. Por último, se propone también la participación del regulador CodZ, que por su homología con CodY y su expresión dependiente del contenido en azúcar en el medio de crecimiento, actuaría como nexo de unión entre la regulación del metabolismo del carbono y el del nitrógeno.

Capítulo 5

Estudio de la Regulación de la Región Promotora del Gen *kivD* de *Lactococcus Lactis* IFPL730. Empleo de Vectores de Fusión Transcripcional con mRFP y GFP como Marcadores de Expresión.

Capítulo 5

Estudio de la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *Lactococcus lactis* IFPL730. Empleo de vectores de fusión transcripcional con mRFP y GFP como marcadores de expresión

5.1. INTRODUCCIÓN

La región anterior del gen *kivD* de *Lactococcus lactis* IFPL730 posee dos presuntas secuencias consenso de promotores con polaridad divergente, una en dirección al gen *kivD* y la otra en la dirección opuesta delante de un operón compuesto por los genes *rmaF* y *rlrC*, pertenecientes a las familias de reguladores MarR y LysR, respectivamente (De la Plaza *et al.*, 2009). El análisis detallado de la secuencia nucleotídica de la región promotora P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD} refleja la presencia de una secuencia de reconocimiento para la unión con el regulador CodY (caja CodY) entre las regiones -10 y -35, además de una secuencia repetida inversa cerca de la región -35. La presencia tanto de la caja CodY como de la secuencia inversa en la región promotora indica una alta posibilidad de que estas estructuras actúen como reguladoras de la transcripción del gen *kivD*. Asimismo, la existencia de los dos genes reguladores, *rmaF* y *rlrC*, también podría repercutir en la regulación de la transcripción del gen *kivD*.

Se ha descrito la construcción de vectores utilizados para la caracterización de promotores divergentes empleando como genes marcadores de clonación los que codifican para actividades enzimáticas como β -glucuronidasa y β -galactosidasa (Parry *et al.*, 1994; Jiwaji *et al.*, 2008) y β -glucuronidasa y GFP (Zhang *et al.*, 2008). El gen *lacZ* también se ha empleado como gen reportero para evaluar la actividad de promotores divergentes en *Saccharomyces cerevisiae* (Partow *et al.*, 2010). Sin embargo, la verificación de la clonación y la detección de expresión de promotores en la mayoría de estos ejemplos requieren la evaluación de la actividad enzimática empleada como marcador de manera discontinua y no simultánea con el crecimiento.

Los genes que codifican proteínas fluorescentes mediante formación autocatalítica del fluoróforo son ideales para ser empleados como marcadores en la evaluación de expresión génica y para un amplio rango de procedimientos de biología molecular en bacterias y levaduras (Fukuda *et al.*, 2000; Chudakov *et al.*, 2005; Frommer *et al.*, 2009). Existe una amplia variedad de vectores que incorporan como marcador la expresión de la proteína fluorescente verde (“green fluorescent protein”, GFP) procedente de *Aequorea victoria*. El gen *gfp* se ha utilizado como marcador de procesos biológicos como actividad y regulación génica, de plegamiento y localización celular de proteínas, y seguimiento *in vitro* e *in vivo* de células marcadas (Widenmann *et al.*, 2009; Alguel *et al.*, 2010). Dentro de los marcadores fluorescentes, se ha perseguido con interés la obtención de proteínas fluorescentes rojas (“red fluorescent protein”, RFP), existiendo en la naturaleza una proteína fluorescente roja procedente de *Discosoma sp.* DsRed. Sin embargo, la principal dificultad en el empleo de esta proteína es que es un tetrámero que madura lentamente. En este sentido, se han obtenido proteínas fluorescentes monoméricas por ingeniería de proteínas mediante mutagénesis dirigida en la secuencia genética de la proteína fluorescente roja DsRed (Shaner *et al.*, 2004). De estas proteínas autofluorescentes, destaca la proteína monomérica mCherry (mRFP), que tiene la ventaja de madurar rápida y completamente, poseer una elevada fotoestabilidad y una excelente resistencia al pH ácido ($pK_a < 4,5$). La proteína GFP, sin embargo, presenta una baja resistencia a la acidez (pK_a de GFP $> 6,6$) que dificulta su uso en bacterias lácticas (BAL). La ventaja del empleo conjunto de ambas proteínas es que los espectros óptimos de excitación y emisión de GFP (488 nm y 511 nm, respectivamente) y mRFP (587 nm y 610 nm, respectivamente) no solapan entre sí lo que hace posible su detección simultánea.

El objetivo de este estudio ha sido la caracterización de los mecanismos genéticos relacionados con la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730. Debido a la naturaleza divergente de la región $P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}$ se procedió a la fusión transcripcional de esa región en un vector de expresión en *L. lactis*, que se construyó con los genes que codifican las proteínas autofluorescente roja (mRFP) y verde (GFP), organizados en sentido divergente.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Microorganismos, plásmidos y medios de cultivo

Los microorganismos, construcciones y plásmidos utilizados en este estudio estan listados en la Tabla 5.1. Las estirpes de *L. lactis* fueron incubadas a 30 °C en caldo M17 (Pronadisa) suplementado con glucosa al 0,5% (GM17). Las bacterias *Enterococcus faecalis* JH2-2 y *Streptococcus pneumoniae* R61 se crecieron en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) (Pronadisa) a 37 °C, y *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826 en caldo MRS (Pronadisa) suplementado con L-cisteína (Panreac) al 0,05% a 37 °C. Las cepas de *E. coli* se incubaron en caldo Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001) a 37 °C con agitación vigorosa. Los medios de cultivo en placa se prepararon añadiendo agar bacteriológico (Pronadisa) a una concentración final de 1,5% (p/v). Cuando fue necesario, los antibióticos eritromicina (Em) y ampicilina (Amp) (Sigma) fueron añadidos al medio de cultivo. La Em fue usada a una concentración final de 5 µg/mL para el crecimiento de *L. lactis* y *E. faecalis*, y a 250 µg/mL para *E. coli*. La Amp fue añadida al medio de cultivo a una concentración final de 5 y 150 µg/mL para el crecimiento de *L. plantarum* y *E. coli*, respectivamente.

Para los ensayos espectrofluorométricos y espectrofotométricos, *L. lactis* MG1363, *E. faecalis* JH2-2 y *E. coli* DH5α se crecieron en un medio químicamente definido (“chemically defined medium”, CDM). La composición del CDM figura en la tabla 3.1 (Cap. 3), aunque en el CDM utilizado en este trabajo la riboflavina no fue añadida al interferir esta vitamina en las lecturas de fluorescencia. Para detectar la expresión inducible o represora de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730, las células de *L. lactis* fueron crecidas en CDM en donde se eliminó el contenido de isoleucina (condiciones inductoras; CDM-i) o se sustituyeron los aminoácidos (Tabla 3.1) por casitona (Pronadisa) al 1,5% (condiciones represoras y equivalentes al crecimiento en GM17; CDM-r) (De la Plaza *et al.*, 2009). A fin de mantener un pH adecuado para la expresión de las proteínas autofluorescentes, el pH de todos los CDMs fue ajustado a 7,0 con el tampón 3-(N-morfolino)propanesulfonato (MOPS) (Sigma).

Tabla 5.1. Microorganismos y plásmidos usados en este estudio.

Microorganismos y plásmidos	Características relevantes	Origen o fuente
Microorganismos		
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	Cepa libre de plásmidos y usada como huésped	Jacob y Hobbs (1974)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Cepa libre de plásmidos y usada como huésped	Sambrook y Russell (2001)
<i>Escherichia coli</i> DH5α (pGreenTIRGFP)	Contiene el plásmido pGreenTIRGFP; Amp ^R	Miller y Lindow (1997)
<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB8826	Contiene el plásmido pTV-mCherry; Amp ^R	NCIMB ^a
<i>Lactococcus lactis</i> IFPL730	Contiene la región promotora del gen <i>kivD</i> (P _{KivD} -P _{RmaF-Rlrc})	De la plaza <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Cepa libre de plásmidos y usada como huésped	Gasson (1983)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R61	Contiene el promotor P _x del operón <i>malXCD</i>	Nieto <i>et al.</i> (2001)
Plásmidos		
pTV-mCherry	Plásmido con el gen <i>mrfp</i> ; Amp ^R	NCIMB ^a
pGreenTIRGFP	Plásmido con el gen <i>gfp</i> ; Amp ^R	Miller y Lindow (1997)
pAK80	Vector de clonación; Em ^R	Israelsen <i>et al.</i> (1995)
pAKmRFP	Vector derivado de pAK80 con el gen <i>mrfp</i> ; Em ^R	Este estudio
pAKmRFP-P _x	Vector derivado de pAKmRFP con el promotor P _x ; Em ^R	Este estudio
pAKmRFPGFP	Vector derivado de pAKmRFP con el gen <i>gfp</i> ; Em ^R	Este estudio
pAKmRFPGFP-P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD}	Vector derivado de pAKmRFPGFP con la región promotora del gen <i>kivD</i> . La expresión de los genes <i>mrfp</i> y <i>gfp</i> está controlada por los promotores P _{KivD} y P _{RmaF-Rlrc} , respectivamente; Em ^R	Este estudio
pAKmRFPGFP-P _{KivD} -P _{RmaF-Rlrc}	Vector derivado de pAKmRFPGFP con la región promotora del gen <i>kivD</i> . La expresión de los genes <i>mrfp</i> y <i>gfp</i> está controlada por los promotores P _{RmaF-Rlrc} y P _{KivD} , respectivamente; Em ^R	Este estudio
pAKmRFPGFP-RMAF-P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD}	Vector derivado de pAKmRFPGFP-P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD} con el gen regulador <i>rmaF</i> ; Em ^R	Este estudio
pAKmRFPGFP-RLRC-RMAF-P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD}	Vector derivado de pAKmRFPGFP-RMAF-P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD} con el gen regulador <i>rlrc</i> ; Em ^R	Este estudio
pAKmRFPGFP-(M1)P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD}	Vector derivado de pAKmRFPGFP-P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD} con modificaciones en la secuencia de la caja CodY de la región promotora P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD} ; Em ^R	Este estudio
pAKmRFPGFP-(M2)P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD}	Vector derivado de pAKmRFPGFP-P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD} con modificaciones en la secuencia repetida inversa de la región promotora P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD} ; Em ^R	Este estudio
pAKmRFPGFP-(M3)P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD}	Vector derivado de pAKmRFPGFP-P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD} con modificaciones en las secuencias de la caja CodY y de la secuencia repetida inversa de la región promotora P _{RmaF-Rlrc} -P _{KivD} ; Em ^R	Este estudio

^a NCIMB: National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Reino Unido

5.2.2. Manipulación del ADN y transformación de *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis*

El ADN plasmídico fue purificado usando el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, modificando el protocolo (para todas las bacterias empleadas en este estudio, a excepción de *E. coli*) con objeto de insertar un paso inicial de lisis enzimática con lisozima (50 mg/mL). Las enzimas de restricción de ADN y la enzima de unión de fragmentos de ADN (ADN ligasa del bacteriófago T4) fueron adquiridas de las casas comerciales Fermentas o New England Biolabs, y usadas según lo recomendado por el fabricante.

Los oligonucleótidos usados como cebadores en la reacciones de PCR fueron sintetizados por Invitrogen y aparecen listados en la tabla 5.2. Las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo empleando la enzima *Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase* (Finnzymes) para obtener copias fidedignas de los fragmentos originales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción de PCR incluyó una desnaturalización inicial (98 °C, 30 s) y varios ciclos de amplificación con una desnaturalización a 98 °C (10 s) y unas condiciones de hibridación y elongación a 72 °C dependientes del fragmento de ADN amplificado (Tabla 5.2). Tanto las muestras de ADN amplificado por PCR como las que procedían de una digestión con enzimas de restricción fueron purificadas con el kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Aquellas muestras de ADN cuyas secuencias nucleotídicas debían ser verificadas, fueron purificadas y enviadas al servicio externo de secuenciación proporcionado por Secugen S.L.

La transformación de *E. coli* DH5- α fue llevada a cabo según lo descrito por Hanahan (1985), empleando células termocompetentes y permitiendo la entrada del ADN mediante choque térmico (42 °C durante 45 s, seguido de 2 min en hielo). La transformación de las células de *L. lactis* MG1363 se realizó de acuerdo al método de Holo y Nes (1989) empleando células electrocompetentes (células crecidas en GM17 en presencia de treonina a 400 mM) y ajustando los parámetros del electroporador (BioRad) a un voltaje de 2,5 kV, una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 200 Ω . La transformación de células electrocompetentes de *E. faecalis* JH2-2 (células crecidas

en medio BHI suplementado con glicina al 2,5%) se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas por Fiedler y Wirth (1991), ajustando los parámetros de electroporación a un voltage de 1,25 kV, a una resistencia de 480 Ω y una capacitancia de 25 μ F. Una vez que las células se transformaron con ADN plasmídico, fueron incubadas en los medios de cultivo apropiados para cada especie durante 90 min y se sembraron en placas de medio sólido adicionado del antibiótico de selección, extendiendo la incubación a 2-3 días.

5.2.3. Construcción de los vectores conteniendo los genes *mrfp* y *gfp*, que codifican para dos proteínas autofluorescentes, mRFP y GFP

El esquema general de la construcción se muestra en la figura 5.1. Para la construcción de los vectores de fusión transcripcional se partió del vector pAK80 (Israelsen *et al.*, 1995). Ese vector contiene un origen de replicación procedente del plásmido pCT1138 de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CRL264 que también es funcional en *E. faecalis* (Marelli y Magni, 2010). Además, pAK80 contiene el origen de replicación procedente del plásmido p15A de *E. coli* que le confiere carácter de vector lanzadera para poder ser propagado también en *E. coli*. Como marcador para la selección de transformantes, pAK80 contiene el gen *ermC*, que confiere resistencia a eritromicina (Em^R) en *E. coli* y en *L. lactis* y *E. faecalis*.

Tabla 5.2. Cebadores empleados y condiciones de PCR.

Gen o región a aplicar	Cebadores empleados	Secuencias ^a 5' → 3'	Enzimas de restricción	Condiciones de PCR		
				Hibridación	Elongación a 72°C	Amplicón generado (pb)
<i>mrfp</i>	FormRFP	AAAA <u>CCCGGG</u> GGATACGCACGAGTTTCAA	<i>SmaI</i>	Ciclos (1-20): 47°C, 10 s	60 s	780
	RevRFP	CGGCGCG <u>GTCGAC</u> TTATTTATATAATAATTCGTCC	<i>Sall</i>	Ciclos (21-30): 68°C, 30 s		
<i>gfp</i>	ForGFP	CCGC <u>CTGCAG</u> TTCTGATTAAC TTATAAGGAGGA	<i>PstI</i>	Ciclos (1-20): 45°C, 10 s	60 s	768
	RevGFP	CCG <u>CTCGAG</u> CCTATTTGTATAGTTCATCCATGCC	<i>XhoI</i>	Ciclos (21-30): 57°C, 60 s Ciclos (31-40): 60°C, 60 s		
P_x	ForP _x	AT <u>CTGCAG</u> CGTGTTAAAATAATGGAACGT	<i>PstI</i>	Ciclos (1-20): 50,5 °C, 10 s	60 s	529
	RevP _x	AT <u>GGATCC</u> CCCCAAAGAATAGCAAGTTTTATTG	<i>BamHI</i>	Ciclos (21-30): 60°C, 60 s Ciclos (31-40): 63°C, 60 s		
P_{RmaF-RlrC} -P_{KivD}	ForP _{KivD}	AGC <u>GGATCC</u> CCGAAGTAAAATAAAGCCAAATC	<i>BamHI</i>	Ciclos (1-20): 53°C, 30 s	30 s	281
	RevP _{KivD}	AGC <u>GGATCC</u> TTTCTTCAATTCCTAACTCGTGTA	<i>BamHI</i>	Ciclos (21-30): 63°C, 30 s		
<i>rmaF</i> -P_{RmaF-RlrC} -P_{KivD}	ForRmaF	AGC <u>GGATCC</u> CCTTGTAATTGATAGTAGTCTTATTAAGACCT	<i>BamHI</i>	Ciclos (1-20): 53°C, 30 s	30 s	772
	RevP _{KivD}	AGC <u>GGATCC</u> TTTCTTCAATTCCTAACTCGTGTA	<i>BamHI</i>	Ciclos (21-30): 63°C, 30 s		
<i>rlrC-rmaF</i> -P_{RmaF-RlrC} -P_{KivD}	ForRlrC	AGC <u>GGATCC</u> TAATTTATTTAGTAGAAGACTTTATCATTTTC	<i>BamHI</i>	Ciclos (1-20): 50°C, 30 s	60 s	1645
	RevP _{KivD}	AGC <u>GGATCC</u> TTTCTTCAATTCCTAACTCGTGTA	<i>BamHI</i>	Ciclos (21-30): 60°C, 30 s		

^a Las secuencias que reconocen las enzimas de restricción aparecen subrayadas y en negrita.

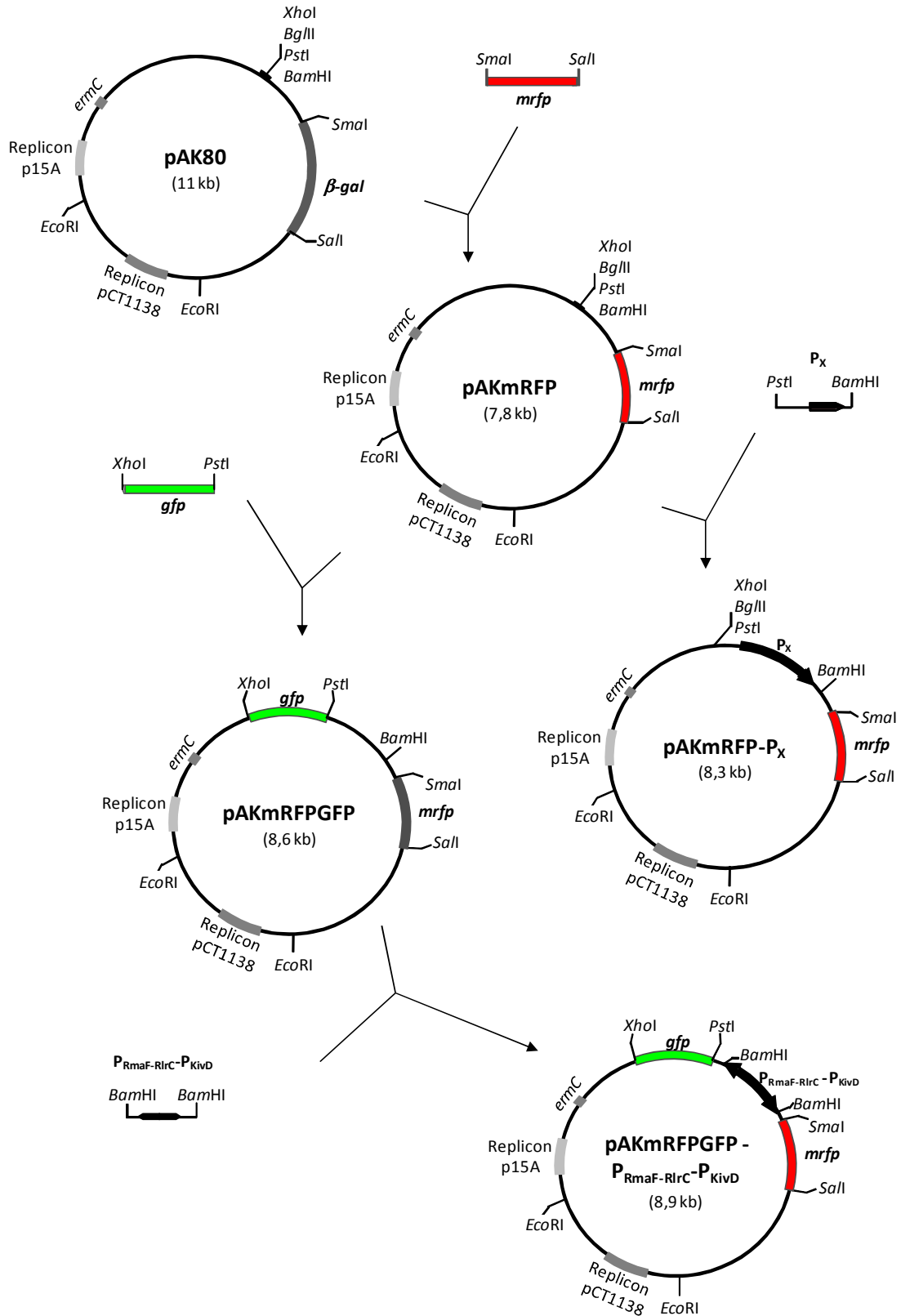


Figura 5.1. Esquema de construcción de los vectores pAKmRFP y pAKmRFPGFP y sus derivados. Para más detalles ver Materiales y métodos (sección 5.2.3). Los genes o regiones relevantes y los productos que codifican son: *mrfp*, codifica para la proteína mRFP; *gfp*, codifica para la proteína GFP; *ermC*, codifica para la proteína responsable de la resistencia a eritromicina; *P_x*, promotor del gen *malXCD*; *P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}*, región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730.

5.2.3.1. Construcción del vector pAKmRFP

El vector pAK80 se digirió con las enzimas de restricción *Sma*I y *Sal*I. Uno de los fragmentos de DNA resultante de 7 kb procedente de pAK80, que contiene los 2 orígenes de replicación y el determinante de Em^R, se separó en un gel de agarosa del 0,8%. Posteriormente, el fragmento se purificó utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) para emplearse como base en la construcción de los plásmidos recombinantes.

El gen que codifica la proteína monomérica con fluorescencia roja mCherry (mRFP), que había sido optimizado en codones para la expresión en bacterias Gram-positivas de alto contenido en A+T, sintetizado químicamente y fusionado al plásmido pTV-mCherry en *L. plantarum* NCIMB8826 (Tabla 5.1), fue proporcionado amablemente por el Dr. Jerry Wells (Universidad de Wageningen, Holanda). El gen *mrfp* fue amplificado por PCR a partir de ADN del plásmido pTV-mCherry, incluyendo en los extremos los sitios de restricción de las enzimas *Sma*I y *Sal*I. Para ello, se emplearon los cebadores específicos FormRFP y RevmRFP (Tabla 5.2), que contienen, respectivamente, los sitios de restricción *Sma*I y *Sal*I. Las condiciones de PCR aparecen detalladas en la Tabla 5.2. El producto de la reacción resultante de 0,8 kb se purificó, se digirió con las enzimas *Sma*I y *Sal*I y se ligó utilizando la ADN ligasa del bacteriofago T4 con el fragmento de 7 kb procedente de pAK80. El plásmido resultante de 7,8 kb llamado pAKmRFP (Fig. 5.1) fue establecido por transformación en *E. coli* DH5α y selección por su Em^R en placas de agar LB. La correcta secuencia nucleotídica del gen optimizado de mRFP y su sitio de unión a los ribosomas presente en pAKmRFP fue verificada por secuenciación del plásmido empleando los cebadores FormRFP y RevmRFP.

5.2.3.2. Construcción del vector pAKmRFP-P_x

Para evaluar la expresión de mRFP durante el crecimiento de bacterias lácticas se clonó el promotor P_x del operón *malXCD* de *S. pneumoniae* R61(Nieto *et al.*, 2001) en el vector pAKmRFP para obtener el vector pAKmRFP-P_x (Fig. 5.1). La región

promotora de *S. pneumoniae* R61 se obtuvo mediante la amplificación por PCR con los cebadores específicos ForP_x y RevP_x, que contienen los sitios de restricción *Pst*I y *Bam*HI, respectivamente (Tabla 5.2). La región promotora de 0,5 kb y pAKmRFP se digirieron con ambas enzimas *Pst*I y *Bam*HI y se ligaron utilizando la ADN ligasa de T4. El plásmido resultante de 8,3 kb (pAKmRFP-P_x) se empleó para transformar *E. coli* DH5α. La correcta fusión de P_x con el gen que codifica para mRFP se confirmó mediante secuenciación del plásmido pAKmRFP-P_x con los cebadores ForP_x y RevmRFP. Para comprobar la utilidad de mRFP como marcador de clonación y expresión en BAL, se transformaron células electrocompetentes de *L. lactis* MG1363 y *E. faecalis* JH2-2 con pAKmRFP-P_x.

5.2.3.3. Construcción del vector pAKmRFPGFP

Para construir el vector pAKmRFPGFP (Fig. 5.1), el gen *gfp* que codifica la proteína autofluorescente GFP se amplificó por PCR a partir del plásmido pGreenTIRGFP, presente en *E. coli* DH5α(pGreenTIRGFP), donde el gen se había optimizado en codones para su expresión en procariotas (Miller y Lindow, 1997). La amplificación por PCR se realizó con los cebadores específicos ForGFP y RevGFP (Tabla 5.2), diseñados para incluir en la clonación el gen *gfp* precedido de su sitio de unión a los ribosomas y para que incorporasen en los extremos 5' y 3' del amplicón, respectivamente, los sitios de restricción para *Pst*I y *Xho*I. El producto de amplificación obtenido de 0,77 kb se ligó mediante la ADN ligasa de T4 con el plásmido pAKmRFP linearizado por digestión también con las enzimas *Pst*I y *Xho*I para generar el plásmido pAKmRFPGFP de 8,6 kb (Fig. 5.1). La secuencia nucleotídica correcta del gen *gfp* insertado en pAKmRFPGFP fue verificada por secuenciación del plásmido empleando los cebadores ForGFP y RevGFP. El plásmido pAKmRFPGFP presenta, por tanto, el gen *gfp* y el gen optimizado para la expresión de mRFP en orientación divergente y a ambos lados de un MCS que contiene los sitios de restricción para *Pst*I, *Bam*HI, y *Sma*I (Fig. 5.1) y es utilizable como vector de fusión transcripcional de promotores divergentes en *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis*.

5.2.3.4. Construcción de los vectores pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y pAKmRFPGFP- P_{KivD} - $P_{RmaF-RlrC}$

El vector pAKmRFPGFP se empleó para evaluar la región promotora divergente que precede al gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 (Fig. 5.2. A). La región denominada $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} , que contiene los promotores divergentes $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} se amplificó empleando ADN cromosómico de *L. lactis* IFPL730 y los cebadores específicos For P_{KivD} y Rev P_{KivD} , en los que se incorporó el sitio de restricción para *Bam*HI (Tabla 5.2). El fragmento de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} de 0,28 kb y pAKmRFPGFP se digirieron con *Bam*HI y se ligaron utilizando la enzima ADN ligasa de T4. El plásmido vector resultante de 8,9 kb, pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (Fig. 5.1), se empleó para transformar *E. coli* DH5 α . La correcta fusión de $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} con los genes que codifican para GFP y mRFP se confirmó mediante la secuenciación del plásmido pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} con los cebadores For P_{KivD} , Rev P_{KivD} , RevmRFP y RevGFP. Se verificó que la expresión de mRFP quedaba controlada por P_{KivD} y la de GFP por $P_{RmaF-RlrC}$. También se construyó el vector pAKmRFPGFP- P_{KivD} - $P_{RmaF-RlrC}$ en el que la expresión de GFP quedaba controlada por P_{KivD} y la de mRFP por $P_{RmaF-RlrC}$ (Fig. 5.2 A). La correcta fusión de ambos promotores al vector pAKmRFPGFP fue verificada mediante secuenciación de los plásmidos obtenidos utilizando los cebadores For P_{KivD} y Rev P_{KivD} .

5.2.4. Caracterización de la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730

La caracterización de la regulación de la expresión de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 se llevó a cabo mediante tres estrategias de fusión transcripcional al plásmido pAKmRFPGFP: (i) verificación de la fuerza y la actividad inducible y represora de los promotores $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} ; (ii) evaluación del efecto de los genes reguladores *rmaF* y *rlrC* sobre la expresión de la región promotora; y (iii) evaluación de la modificación de las secuencias nucleotídicas de la caja CodY y de la estructura repetida inversa presentes en la región promotora (esquemas en Figs. 5.2 y 5.3).

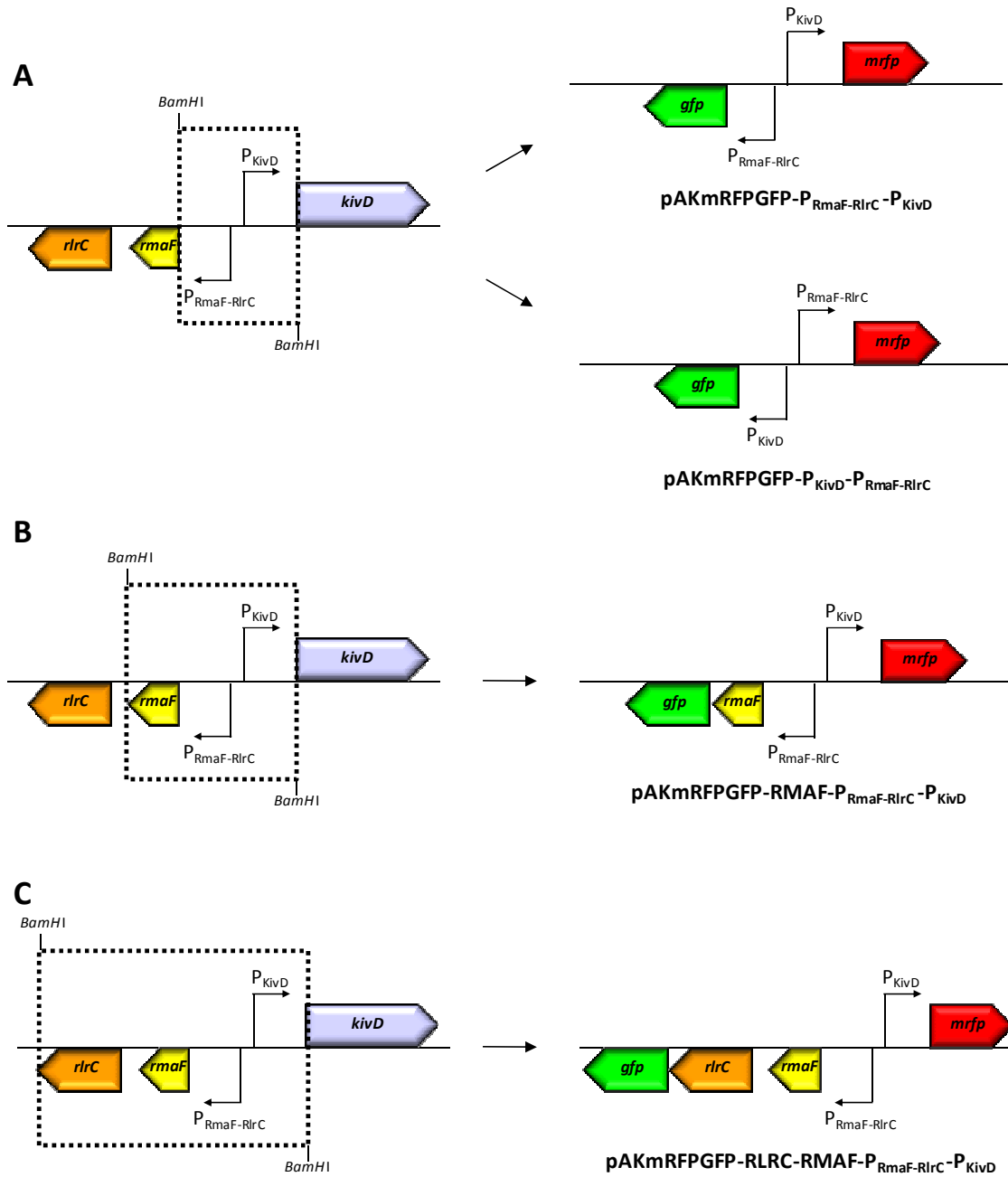
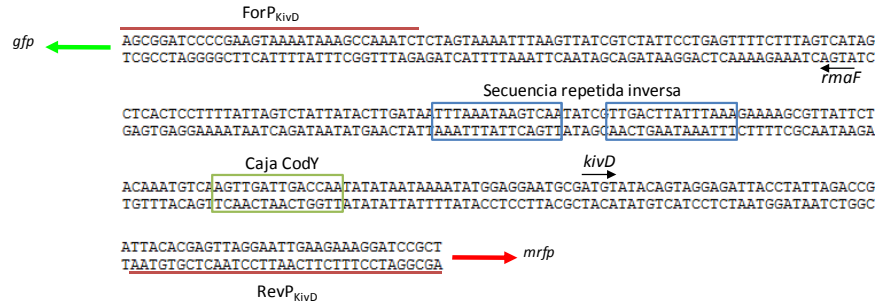


Figura 5.2. Regiones de ADN de *L. lactis* IFPL730 amplificadas por PCR (línea de puntos) y fusionadas al vector pAKmRFP-GFP para originar los vectores derivados (A, B y C). A: los vectores pAKmRFP-GFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y pAKmRFP-GFP- P_{KivD} - $P_{RmaF-RlrC}$ contienen solo la región promotora divergente. En pAKmRFP-GFP- $P_{RmaF-RlrC}$ la expresión de los genes *mrfp* y *gfp* está controlada por los promotores P_{KivD} y $P_{RmaF-RlrC}$, respectivamente, mientras que en pAKmRFP-GFP- P_{KivD} - $P_{RmaF-RlrC}$ la expresión de los genes *mrfp* y *gfp* está controlada por los promotores $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} , respectivamente. B: el vector pAKmRFP-GFP-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} contiene la región promotora divergente y el gen regulador *rmaF*. C: el vector pAKmRFP-GFP-RMAF-RLRC- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} contiene la región promotora divergente y los genes reguladores *rmaF* y *rlrC*.

A: pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}



B: pAKmRFPGFP-(M1)P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}



C: pAKmRFPGFP-(M2)P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}



D: pAKmRFPGFP-(M3)P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}



Figura 5.3. Esquema de la región promotora divergente P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD} de *L. lactis* IFPL730. Las regiones original (A) y modificadas (B, en la secuencia de la caja CodY; C, en la secuencia repetida inversa; y D, en las secuencias de la caja CodY y de la secuencia repetida inversa) fueron fusionadas al vector pAKmRFPGFP para originar los vectores derivados (A, pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}; B, pAKmRFPGFP-(M1)P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}; C, pAKmRFPGFP-(M2)P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}; y D, pAKmRFPGFP-(M3)P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}). La dirección de transcripción de los promotores en esos vectores está representada con las flechas roja y verde (dirigida hacia la expresión de *mrfp* y *gfp*, respectivamente).

5.2.4.1. Verificación de la fuerza y la actividad inducible y represora de los promotores $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD}

La diferente fuerza de los promotores $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} fue verificada mediante la comparación de los ratios de expresión de fluorescencia de GFP y mRFP durante el crecimiento (ratio RFU/DO₄₈₀) de *L. lactis* MG1363 conteniendo los vectores pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y pAKmRFPGFP- P_{KivD} - $P_{RmaF-RlrC}$ (Fig. 5.2 A) en CDM sin isoleucina (condiciones inductoras) o con casitona (condiciones represoras).

5.2.4.2. Evaluación del efecto de los genes reguladores *rmaF* y *rlrC* sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD}

El efecto de la presencia de los genes reguladores *rmaF* y *rlrC* sobre la regulación de la transcripción a partir de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} de *L. lactis* IFPL730 fue evaluada mediante comparación de la expresión de fluorescencia de GFP y mRFP durante el crecimiento de *E. coli* DH5 α y *L. lactis* MG1363 conteniendo los vectores derivados de la fusión transcripcional del vector pAKmRFPGFP con (i) la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y el gen *rmaF*, originando el vector pAKmRFPGFP-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (Fig. 5.2 B); y (ii) la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y los genes *rlrC* y *rmaF*, originando el vector pAKmRFPGFP-RLRC-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (Fig. 5.2 C). Las regiones *rmaF*- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y *rlrC*-*rmaF*- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} se amplificaron empleando ADN cromosómico de *L. lactis* IFPL730 con los cebadores y en las condiciones que figuran en la tabla 5.2. Tanto el vector pAKmRFPGFP como los fragmentos amplificados se digirieron con *Bam*HI y se ligaron utilizando la enzima ADN ligasa de T4. Los plásmidos resultantes, pAKmRFPGFP-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (9,3 kb) y pAKmRFPGFP-RLRC-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (10,2 kb) se emplearon para transformar *E. coli* DH5 α . La correcta fusión con los genes que codifican para GFP y mRFP se confirmó mediante la secuenciación de los amplicones originados por PCR con los cebadores ForRmaF, ForRlrC, For P_{KivD} , Rev P_{KivD} , RevmRFP y RevGFP. Se verificó que la expresión de mRFP quedaba controlada por P_{KivD} y la de GFP bien por $P_{RmaF-RlrC}$ y el regulador *rmaF* (Fig. 5.2 B), o bien, por $P_{RmaF-RlrC}$ y los reguladores *rlrC* y *rmaF* (Fig. 5.2 C). Posteriormente, los plásmidos obtenidos

se utilizaron para transformar *L. lactis* MG1363, volviéndose a confirmar las construcciones mediante secuenciación.

5.2.4.3. Evaluación de la modificación de las secuencias nucleotídicas de la caja CodY y de la estructura repetida inversa presentes en la región promotora $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$

El efecto de la caja CodY y la estructura repetida inversa presentes en la región $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ sobre la regulación de la transcripción del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 fue evaluado mediante comparación de la expresión de fluorescencia de GFP y mRFP en *E. coli* DH5 α y *L. lactis* MG1363 conteniendo los vectores derivados de la fusión transcripcional del vector pAKmRFPGFP con la región promotora que contenía mutaciones dirigidas en la secuencia de nucleótidos de la caja CodY y en la secuencia repetida inversa (Fig. 5.3). Para ello, se sintetizaron químicamente (GenScript) 3 fragmentos de ADN equivalentes a la región promotora $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ con modificaciones en la secuencia de nucleótidos. En la primera (M1), se modificó la secuencia de la caja CodY con el objetivo de anular el sitio de reconocimiento del regulador CodY (Fig. 5.3 B); en la segunda (M2), se modificó la secuencia repetida inversa (Fig. 5.3 C), para anular la repetición de secuencia; y en la tercera (M3), se combinaron ambas modificaciones (Fig. 5.3 D). En la síntesis de los 3 fragmentos se incorporó el sitio de restricción para *Bam*HI en ambos extremos. Los fragmentos sintetizados y pAKmRFPGFP se digirieron con *Bam*HI y se ligaron utilizando la enzima ADN ligasa de T4. Los vectores resultantes de 8,9 kb, pAKmRFPGFP-(M1) $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$, pAKmRFPGFP-(M2) $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ y pAKmRFPGFP-(M3) $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ (Fig. 5.3), se emplearon para transformar *E. coli* DH5 α . La correcta fusión de las regiones promotoras $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ modificadas con los genes que codifican para GFP y mRFP, así como la secuencia de nucleótidos de los fragmentos mutados, fueron confirmados mediante la secuenciación de los plásmidos obtenidos con los cebadores For P_{KivD} , Rev P_{KivD} , RevmRFP y RevGFP. Posteriormente, los vectores obtenidos se utilizaron para transformar *L. lactis* MG1363, volviéndose a confirmar las construcciones mediante secuenciación.

5.2.5. Determinación simultánea de la expresión de fluorescencia de mRFP o mRFP/GFP y el crecimiento celular

Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado en microplacas estériles de 96 pocillos con tapa (Nunc), con un volumen de 300 μ l de medio de cultivo por pocillo, usando un lector de microplacas automático (*Varioskan Flash*, Thermo Fisher Scientific). Las microplacas utilizadas tenían la particularidad de presentar en las paredes de cada pocillo un revestimiento con material opaco para permitir la determinación de fluorescencia y un fondo transparente, apto para las medidas de densidad óptica.

Todas las cepas que contenían los vectores que expresaban mRFP o mRFP/GFP fueron crecidas en su medio específico (sección 5.2.1) a una densidad óptica a 480 nm (DO_{480}) de 1. Las células fueron recogidas por centrifugación (4000 g , 10 min, 4 °C), lavadas dos veces, resuspendidas en solución salina (0,85%) e inoculadas (10%) en CDM sin riboflavina (pH 7.0). Las microplacas fueron incubadas a 30 °C para *L. lactis* y a 37 °C para *E. faecalis* y *E. coli* y se tomaron simultáneamente, a intervalos de 1 h, medidas de densidad óptica (DO_{480}), y de fluorescencia de mRFP (en aquellas estirpes con el vector pAKmRFP- P_X), o de mRFP y GFP (en aquellas estirpes con el vector que presentaba los genes *mrfp* y *gfp*). Las condiciones de excitación y emisión de fluorescencia fueron de 587/612 nm para mRFP y de 488/511 para GFP, respectivamente. Los valores de emisión de fluorescencia de las estirpes portadoras de los vectores con las proteínas fluorescentes fueron corregidos con aquellos obtenidos de las estirpes isogénicas no portadoras de dichos vectores. Todos los ensayos se realizaron sobre muestras procedentes de 3 cultivos independientes.

La expresión inducible y represora de los promotores $P_{RmaF-Rlrc}$ y P_{KivD} se determinó cuantificando la expresión simultánea de GFP y mRFP por medida de fluorescencia durante el crecimiento celular de *L. lactis* MG1363 conteniendo los vectores pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-Rlrc}$ - P_{KivD} y pAKmRFPGFP- P_{KivD} - $P_{RmaF-Rlrc}$ en CDM sin isoleucina (condiciones inductoras) o con casitona (condiciones represoras). Para establecer las diferencias de expresión entre GFP y mRFP se calcularon los ratios fluorescencia/ DO_{480} (RFU/ DO).

5.2.6. Detección de la expresión de las proteínas mRFP y GFP mediante microscopía de fluorescencia

Para determinar la expresión de las proteínas fluorescentes mRFP y GFP en células individuales de las poblaciones bacterianas se procedió a su detección mediante microscopía de fluorescencia. Las estirpes se crecieron en CDM sin riboflavina. Muestras de 1 ml de los cultivos a una DO_{480} de 0,6 se centrifugaron y las bacterias sedimentadas fueron lavadas y resuspendidas en tampón PBS (10 mM Na_2HPO_4 , 1mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 3 mM KCl), pH 8. Estas muestras se analizaron sin fijación previa utilizando un microscopio multiin vivo de óptica invertida, Leica AF6000 LX modelo DMI6000B (Leica Microsystems) equipado con una cámara monocroma Hamamatsu CCD C9100-02 (Leica Microsystems) con un objetivo $\times 100$ y una apertura numérica de 1,6. La iluminación se realizó con una lámpara de mercurio de luz fluorescente de HG 100 W, utilizando un filtro de emisión para dejar pasar las luces roja y verde. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el programa FRET (Leica Microsystems).

Adicionalmente, se procedió a comparar la expresión de mRFP y GFP en cultivos de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD}) crecidos en condiciones de represión y de inducción de la expresión de las proteínas fluorescentes. Así, *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD}) fue crecido en un CDM con casitona (condiciones de represión) hasta una DO_{480} de 0,6. El cultivo fue dividido en dos subcultivos: el primero fue procesado para su análisis por microscopía como se ha descrito previamente; el segundo fue centrifugado y las células fueron resuspendidas en un CDM sin isoleucina (condiciones de inducción), y después de 12 y 20 horas de incubación a 30 °C, se tomaron muestras y fueron procesadas para su análisis por microscopía.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Verificación de la expresión del gen sintético que codifica para mRFP en bacterias lácticas mediante la clonación bajo el promotor P_x

El vector pAKmRFP-P_x, conteniendo el gen que codifica para la proteína autofluorescente mRFP bajo el control del promotor P_x, se empleó para transformar *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron colonias de transformantes resistentes a eritromicina con una intensa coloración rojiza que verificaba la expresión de mRFP (resultados no mostrados). Para comprobar la utilidad de mRFP como marcador de clonación y expresión en bacterias lácticas, se transformaron *L. lactis* MG1363 y *E. faecalis* JH2-2 con pAKmRFP-P_x. La clonación de P_x y expresión de mRFP en estas especies se observó visualmente por la coloración de las colonias transformantes con un color rojo intenso en *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-P_x) y asalmonado en *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-P_x) (resultados no mostrados).

La determinación de expresión de fluorescencia de mRFP bajo el control del promotor P_x durante el crecimiento celular se monitorizó en las estirpes *E. coli* DH5 α , *L. lactis* MG1363 y *E. faecalis* JH2-2 (portadoras de pAKmRFP-P_x) simultáneamente mediante espectrofluorimetría y espectrofotometría. La Fig. 5.4 (A, C y D) muestra los valores de fluorescencia roja (UFR) correspondientes a los resultados de emisión de fluorescencia de las estirpes *E. coli* DH5 α (pAKmRFP-P_x), *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-P_x) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-P_x) corregidos con los valores obtenidos de las estirpes isogénicas no portadoras de pAKmRFP-P_x. En los tres casos, se observó que la expresión de fluorescencia evolucionaba de manera paralela al crecimiento de las estirpes. Además, la fluorescencia de la proteína mRFP permitió detectar las células de *L. lactis*, *E. faecalis* y *E. coli* portadoras de pAKmRFP-P_x por microscopía de fluorescencia (Fig. 5.4 B, D y F).

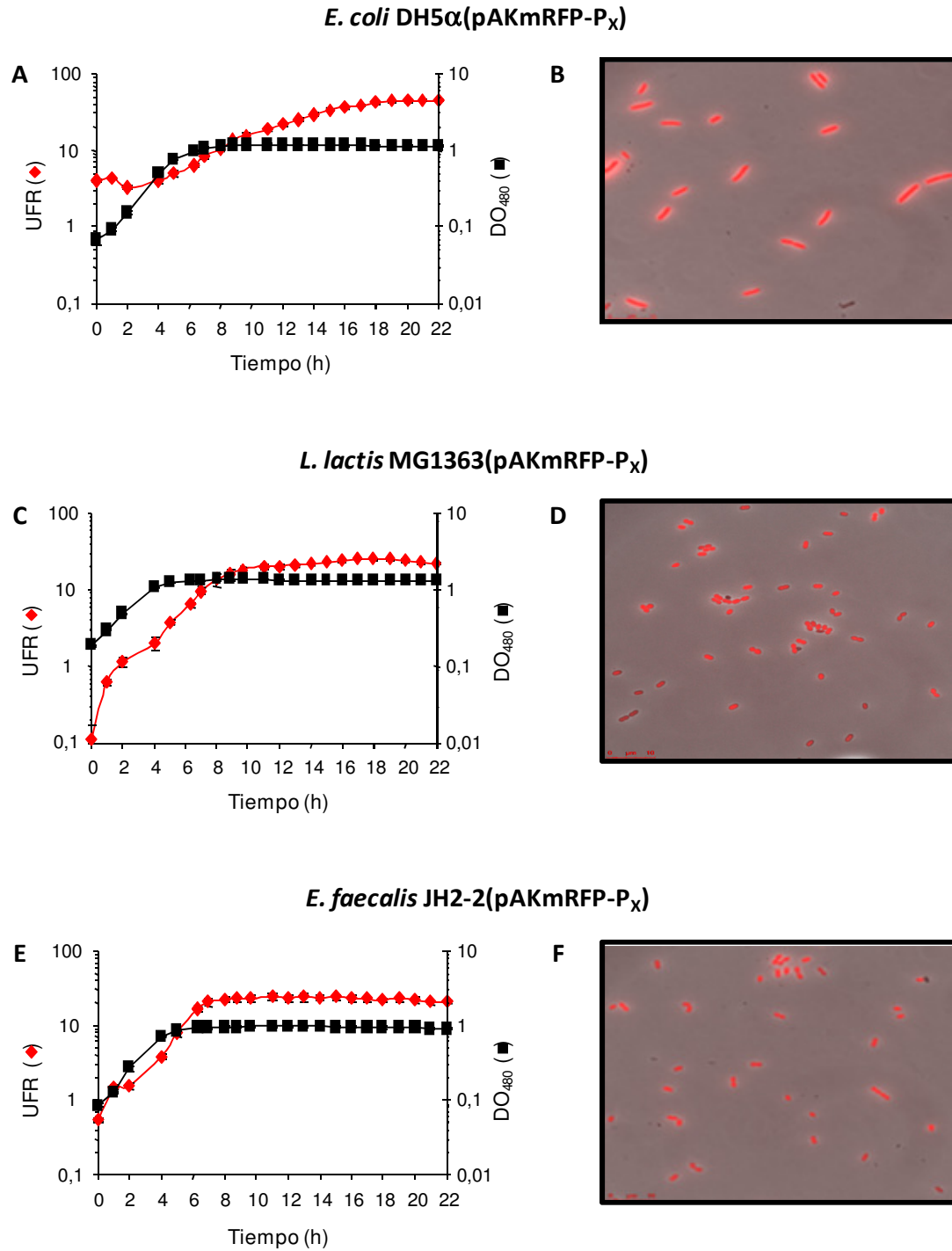


Figura 5.4. Detección de fluorescencia roja en bacterias que contienen el vector pAKmRFP-P_X. Emisión de fluorescencia roja (UFR, ♦) durante el crecimiento (DO₄₈₀, ■) de *E. coli* DH5 α (pAKmRFP-P_X) (A), *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-P_X) (C) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-P_X) (E). Imágenes por microscopía de fluorescencia de células fluorescentes de *E. coli* DH5 α (pAKmRFP-P_X) (B), *L. lactis* MG1363(pAKmRFP-P_X) (D) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFP-P_X) (F) que expresan la proteína fluorescente roja mRFP.

5.3.2. Identificación de estirpes de *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis* que expresan simultáneamente los genes que codifican para mRFP y GFP mediante la clonación bajo la región promotora $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$

Para evaluar la expresión simultánea de las fluorescencias de las proteínas GFP y mRFP como marcadores de clonación de regiones conteniendo promotores divergentes, se procedió a la clonación del vector pAKmRFPGFP con la región que precede al gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 ($P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$). El vector resultante, pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$, se empleó para transformar *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron transformantes resistentes a eritromicina con una coloración marrón que evidenciaba la expresión simultánea de GFP y mRFP bajo el control de $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} , respectivamente, validando así la funcionalidad de los dos promotores, y que se diferenciaban claramente de la expresión sólo de mRFP o GFP (resultados no mostrados). El plásmido se utilizó para transformar *L. lactis* MG1363 y *E. faecalis* JH2-2 en donde se verificó la funcionalidad del vector como marcador de clonación y expresión en bacterias lácticas de regiones promotoras divergentes. El carácter regulable de la región promotora en *L. lactis* (ver sección 5.3.3) resultó en una marcada expresión a partir de P_{KivD} y, por tanto, en una mayor expresión de mRFP que se evidenció en una coloración más rojiza de las colonias de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$) en comparación con las de *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$) y *E. coli* DH5 α (pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$) (resultados no mostrados).

La expresión simultánea de GFP y mRFP, se cuantificó por medida de fluorescencia durante el crecimiento celular de *E. coli* DH5 α (pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$) (Fig. 5.5 A), *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$) (Fig. 5.5 B) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$) (Fig. 5.5 C) en CDM sin riboflavina. La incorporación de glucosa al 0,5% y de tampón MOPS 0,19 M, que permite mantener el pH del cultivo alrededor de 7,0, evitó la pérdida de fluorescencia del fluoróforo procedente de GFP que se produce a valores de pH ácidos.

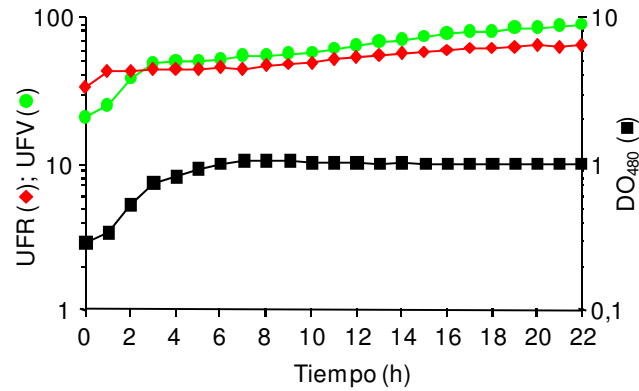
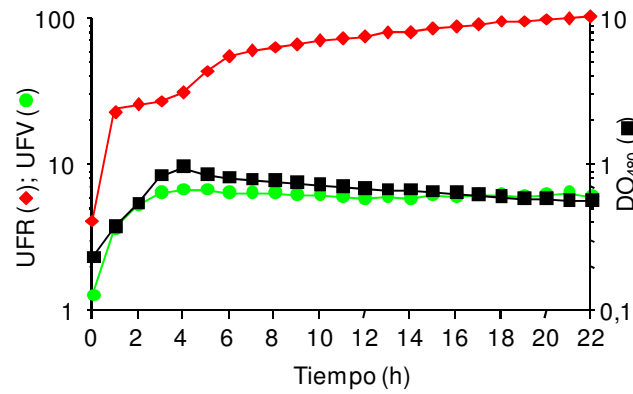
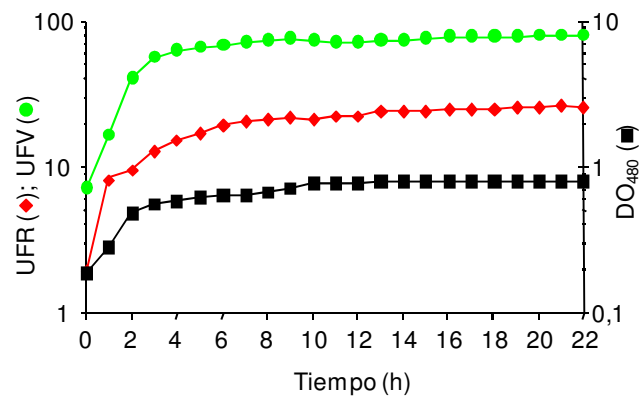
A: *E. coli* DH5 α (pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD})**B: *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD})****C: *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD})**

Figura 5.5. Detección de fluorescencia roja y verde en bacterias que contienen el vector pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}. Emisión de fluorescencia roja (UFR, ♦) y fluorescencia verde (UFV, ●) durante el crecimiento (DO₄₈₀, ■) de *E. coli* DH5 α (pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}) (A), *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}) (B) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}) (C).

De igual forma que se había observado en las colonias crecidas en placas, la expresión de mRFP fue superior en *L. lactis* en relación a la observada en las otras dos especies, y siguió incrementando durante la fase estacionaria (Fig. 5.5 B). La expresión de fluorescencia por GFP y mRFP fue equivalente en *E. coli* DH5 α (pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) (Fig. 5.5 A), registrándose valores elevados en ambos casos desde el inicio del crecimiento. Esta característica corroboraba el color marrón de las colonias de esta estirpe de *E. coli* DH5 α . Por otro lado, *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) (Fig. 5.5 C) mostró mayores valores de expresión de GFP que de mRFP, observándose por tanto una coloración más verdosa de las colonias crecidas en placa (resultados no mostrados). En todos los casos se observó que la fluorescencia de GFP y mRFP evolucionaba de manera paralela al crecimiento de las estirpes.

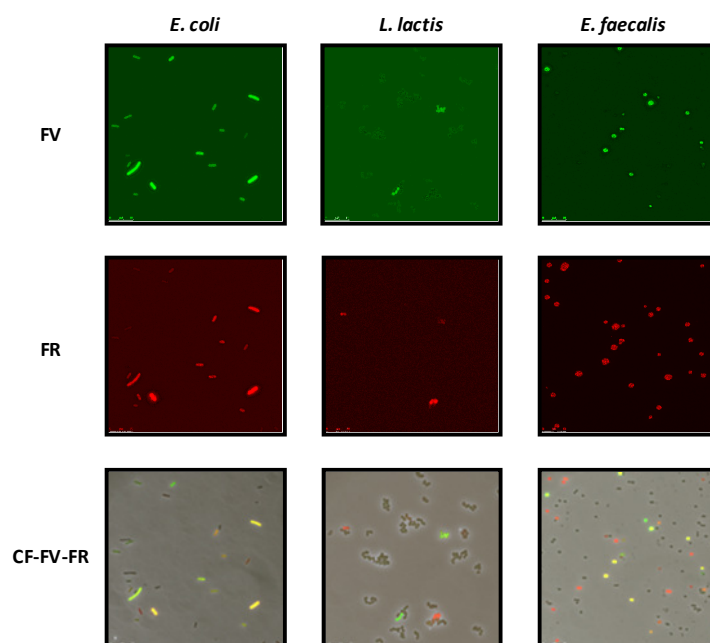


Figura 5.6. Detección de la expresión de las proteínas mRFP y GFP mediante microscopía de fluorescencia. Imágenes por microscopía de fluorescencia de células fluorescentes de *E. coli* DH5 α (pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) (*E. coli*), *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) (*L. lactis*) y *E. faecalis* JH2-2(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) (*E. faecalis*), expresando las proteínas fluorescentes roja (mRFP) y verde (GFP). FV, fluorescencia verde; FR, fluorescencia roja; CF-FV-FR, contraste de fases entre FV y FR.

La fluorescencia de las proteínas mRFP y GFP permitió detectar las células de *E. coli*, *L. lactis* y *E. faecalis*, portadoras de pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} por microscopía de fluorescencia (Fig. 5.6). La superposición de las imágenes obtenidas con contraste de fase y con iluminación fluorescente para detectar los dos fluoróforos reveló que tanto en los cultivos de *E. coli* como en los de *L. lactis* y *E. faecalis*, la mayoría de las bacterias mostró fluorescencia debida a la expresión de las proteínas mRFP y GFP (Fig. 5.6).

5.3.3. Detección de la expresión inducible y represora de $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y comparación de la fuerza de los promotores $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} mediante evaluación simultánea de fluorescencia procedente de GFP y mRFP en tiempo real durante el crecimiento de *L. lactis*

Se había demostrado previamente que la expresión a partir de los promotores P_{KivD} y $P_{RmaF-RlrC}$ en *L. lactis* IFPL730 está afectada por la presencia de aminoácidos ramificados y por el contenido en péptidos del medio de cultivo, probablemente debido a una regulación mediada por CodY (De la Plaza *et al.*, 2009). En ese trabajo, los resultados mostraron que la isoleucina es el principal efector de la regulación, de tal manera que la ausencia de isoleucina impide la acción represora de CodY sobre los promotores.

Para detectar la expresión inducible y represora de $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} , se cuantificó la expresión simultánea de GFP y mRFP por medida de fluorescencia durante el crecimiento celular de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD}) en CDM con casitona (hidrolizado enzimático de caseína; condiciones represoras y equivalentes al crecimiento en M17; CDM-r) (Fig. 5.7 A) o se eliminó la isoleucina (condiciones inductoras; CDM-i) (Fig. 5.7 C). Para establecer las diferencias de expresión entre GFP y mRFP se calcularon los ratios fluorescencia/ DO_{480} (RFU/ DO). Al igual que se observó en la Fig. 5.5 B, la proporción de la expresión relativa de mRFP incrementaba durante la fase estacionaria, incremento que resultó ser exponencial en condiciones inductoras (Fig. 5.7 C). En condiciones represoras, el incremento de fluorescencia relativa de

mRFP fue marcadamente inferior (Fig. 5.7 A). Por otro lado, la expresión de GFP también fue superior en condiciones inductoras, aunque no se observó variación significativa en función de la fase de crecimiento.

La hipótesis de que la mayor expresión de mRFP en *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) se debía a la fuerza del promotor P_{KivD}, en contraposición a que las diferencias de emisión de fluorescencia podrían ser debidas a la mayor sensibilidad al pH de GFP que mRFP (aunque el pH del cultivo se mantuvo estable entre 6,7-6,9 durante todo el tiempo de incubación), se demostró mediante la clonación de la región promotora P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD} en el plásmido pAKmRFPGFP en el sentido contrario (Fig. 5.2 A), de tal manera que las expresiones de mRFP y GFP quedaran controladas por los promotores P_{RmaF-Rlrc} y P_{KivD}, respectivamente. En base a esto, se llevó a cabo la cuantificación simultánea de la expresión de GFP y mRFP por medida de fluorescencia durante el crecimiento celular de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-P_{RmaF-Rlrc}) en condiciones represoras e inductoras (Fig. 5.7 B y D, respectivamente). El crecimiento en condiciones inductoras de *L. lactis* dio lugar a un incremento de la expresión relativa de GFP, marcadamente superior que la de mRFP durante la fase estacionaria de crecimiento, y resultó en la obtención de colonias de *L. lactis* de color verde intenso (resultados no mostrados). Estos resultados confirman que las diferencias en la expresión de fluorescencia se debieron a la mayor fuerza del promotor P_{KivD}.

Adicionalmente, se procedió a comparar la expresión de mRFP y GFP en cultivos de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) crecidos en condiciones de represión y de inducción mediante microscopía de fluorescencia. En la superposición de las imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fases y de fluorescencia para detectar mRFP y mGFP se pudo apreciar que las bacterias crecidas en condiciones de represión mostraron tan sólo bajos niveles de expresión de la mRFP, mientras que después de 12 y 20 h de inducción se observó una prevalencia de la expresión de mRFP detectándose una coloración marrón de las bacterias.

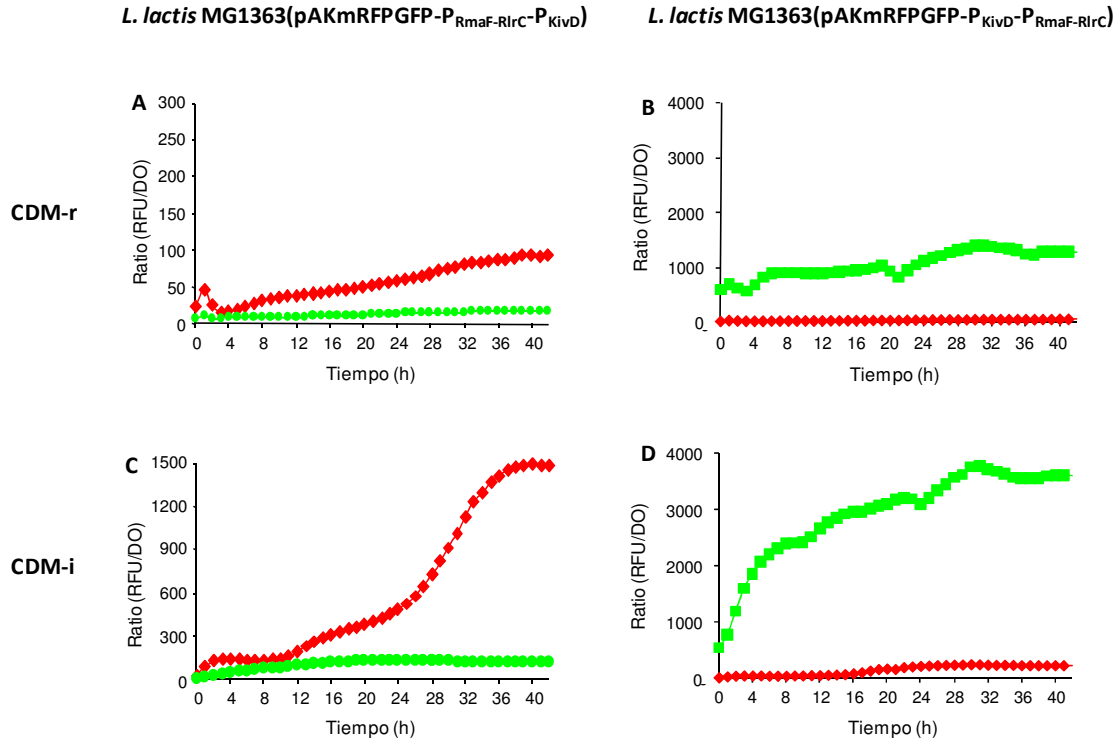


Figura 5.7. Detección de la expresión inducible y represora de los promotores P_{KivD} y P_{RmaF-Rlrc}. Ratio de expresión (RFU/DO) de fluorescencia roja (línea roja) y fluorescencia verde (línea verde) durante el crecimiento de *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) (A y C) y *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{KivD}-P_{RmaF-Rlrc}) (B y D) en medio químicamente definido (CDM) que contiene casitona (condiciones represoras) (CDM-r) y en CDM en ausencia de isoleucina (condiciones inductoras) (CDM-i).

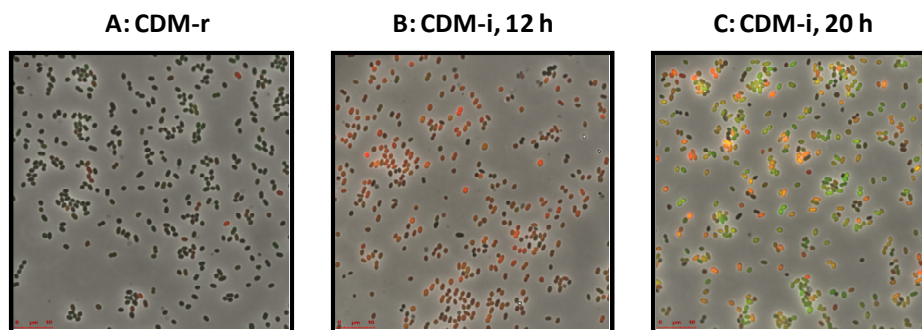


Figura 5.8. Detección de la expresión inducible y represora de los promotores P_{KivD} y P_{RmaF-Rlrc} mediante microscopía de contraste de fases. Se muestra la expresión de las proteínas mRFP y GFP mediante microscopía de contraste de fases en *L. lactis* MG1363(pAKmRFPGFP-P_{RmaF-Rlrc}-P_{KivD}) crecido en (A) en medio químicamente definido (CDM) que contiene casitona (condiciones represoras) (CDM-r), (B) en CDM en ausencia de isoleucina (condiciones inductoras) (CDM-i) a las 12 h de crecimiento y (C) en CDM-i a las 20 h de crecimiento.

5.3.4. Efecto de los genes reguladores *rmaF* y *rlrC* sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} mediante evaluación simultánea de fluorescencia procedente de GFP y mRFP en tiempo real durante el crecimiento de *L. lactis*

Con objeto de evaluar el efecto de la presencia de los genes reguladores *rmaF* y *rlrC* sobre la transcripción a partir de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} de *L. lactis* IFPL730, se compararon los ratios RFU/DO de la expresión simultánea de GFP y mRFP durante el crecimiento en CDM de *E. coli* DH5 α y *L. lactis* MG1363 conteniendo los vectores pAKmRFPGFP-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (Fig. 5.2 B) y pAKmRFPGFP-RLRC-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (Fig. 5.2 C) con los ratios obtenidos por esas estirpes conteniendo el vector sin genes reguladores (pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD}). Los resultados se muestran en la figura 5.9.

Los resultados mostraron que tanto la presencia de un solo gen (*rmaF*) como de ambos genes reguladores (*rmaF* y *rlrC*) provocaron, en comparación con la ausencia de esos genes, una menor expresión de mRFP bajo la acción del promotor P_{KivD} durante el crecimiento en CDM de *E. coli* y *L. lactis* (Fig. 5.9 A y C). Sin embargo, el ratio de expresión de GFP (expresión del promotor $P_{RmaF-RlrC}$) presentó un perfil diferente según la especie. Se observó un aumento de expresión de GFP (cercana al doble) en *L. lactis* MG1363 conteniendo únicamente el gen *rmaF* (Fig. 5.9 B), mientras que en *E. coli* no se observaron cambios de expresión de GFP al incluir la expresión del gen *rmaF* (Fig. 5.9 D). Cuando se compararon los ratios de expresión obtenidos entre mRFP y GFP para cada una de las tres condiciones (ausencia de genes reguladores, presencia de *rmaF* y presencia de *rlrC* y *rmaF*) en ambas estirpes, se observó que los ratios en *E. coli* eran similares, probablemente consecuencia del comportamiento constitutivo de los promotores $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} en esta especie. Por el contrario, los ratios obtenidos al comparar la expresión entre mRFP y GFP en *L. lactis* mostraron en todos los casos que la expresión de mRFP fue superior que la de GFP, es decir, que la actividad promotora de P_{KivD} fue superior que la de $P_{RmaF-RlrC}$, aunque esta diferencia, a la vista de los resultados obtenidos, no podría explicarse por el efecto de los genes reguladores *rlrC* y

rmaF. No obstante, en términos de expresión relativa de GFP, el gen *rmaF* provocó una regulación positiva sobre el promotor $P_{RmaF-RlrC}$.

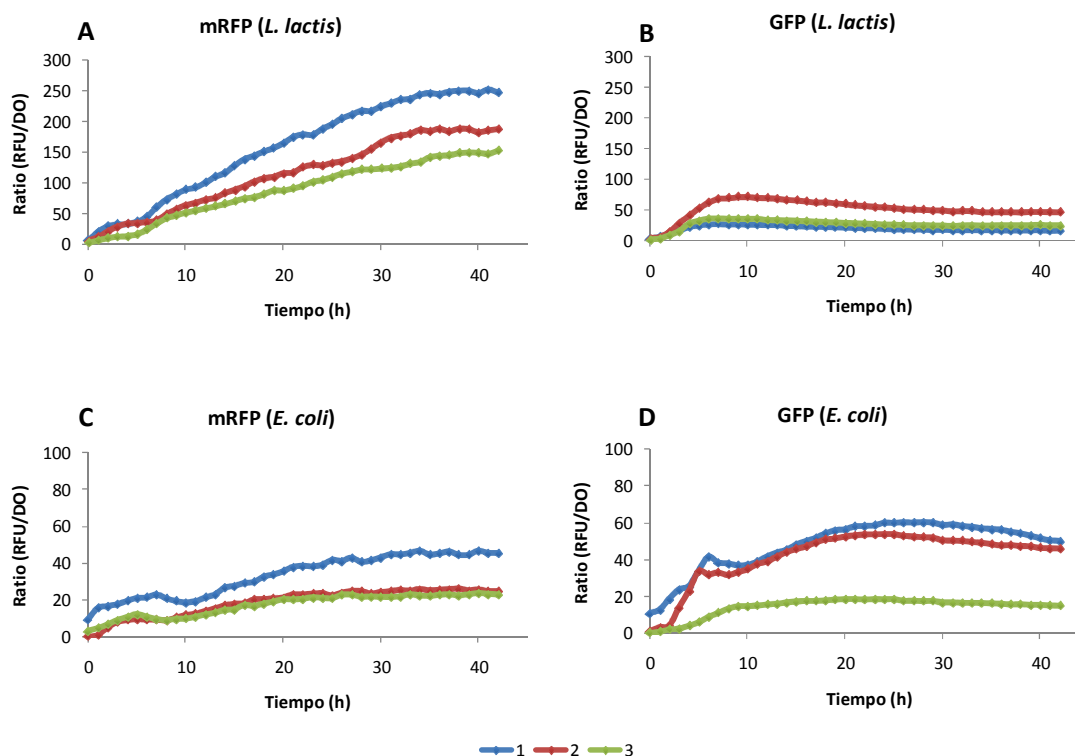


Figura 5.9. Efecto de los genes reguladores *rmaF* y *rlrC* sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} . Ratios de expresión de fluorescencia (RFU/DO) de mRFP y GFP durante el crecimiento en medio químicamente definido de *L. lactis* MG1363 (A y B) y *E. coli* DH5 α (C y D) conteniendo los vectores pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (1), pAKmRFPGFP-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (2) y pAKmRFPGFP-RLRC-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (3).

Adicionalmente, para comprobar si el contenido en péptidos y aminoácidos en el medio de crecimiento tenía un efecto regulador sobre la expresión de la región promotora y en presencia de los genes reguladores, se creció a *L. lactis* MG1363 conteniendo los vectores pAKmRFPGFP-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y pAKmRFPGFP-RLRC-RMAF- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} en condiciones de inducción (CDM sin isoleucina) y de represión (CDM con casitona). La expresión de GFP y mRFP obtenida en *L. lactis* en estas condiciones se comparó con las obtenidas durante el crecimiento en CDM (Fig. 5.10). Al igual que se observó para *L. lactis* MG1363 pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} (Fig. 5.7 A y C), la expresión de mRFP y GFP incrementó en las condiciones inductoras y algo inferior para las condiciones represoras, al comparar con las condiciones de crecimiento en CDM. La expresión de GFP fue de nuevo mayor en presencia del gen

rmaF y en condiciones inductoras, mientras que la expresión adicional del gen *rlcC* causó un descenso de expresión de GFP en todas las condiciones de crecimiento.

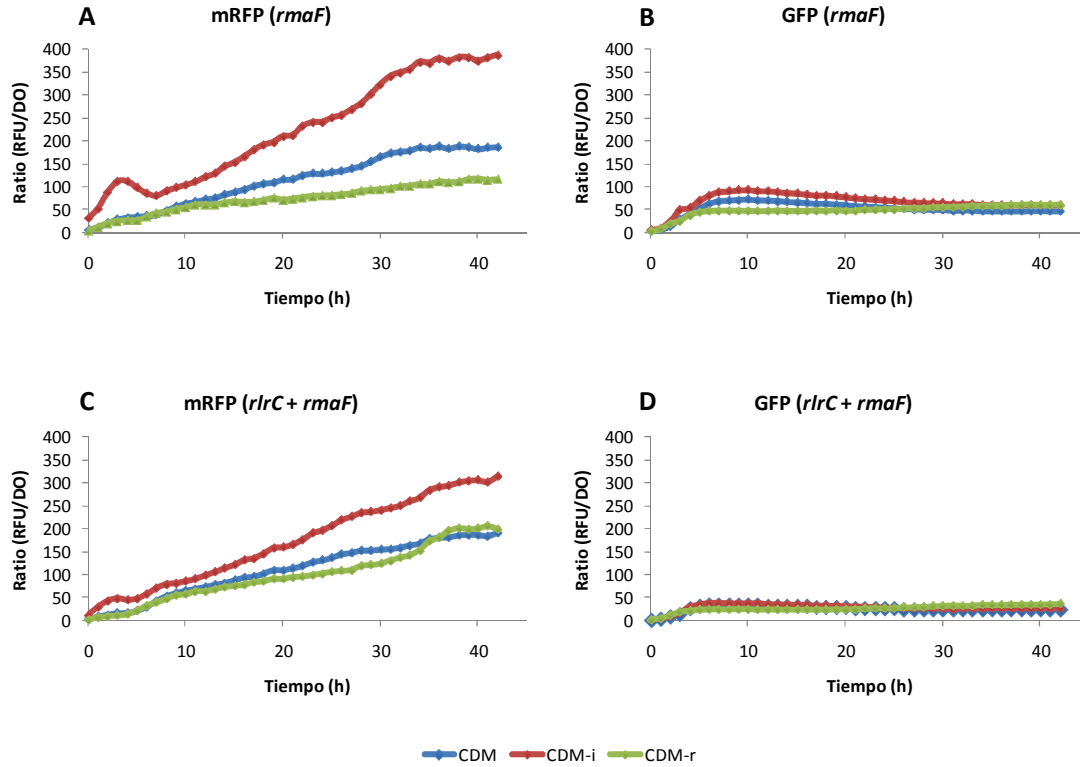


Figura 5.10. Efecto del contenido de aminoácidos y péptidos sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$ y los genes reguladores *rmaF* y *rlrC*. Ratios de expresión de fluorescencia (RFU/DO) de mRFP y GFP durante el crecimiento de *L. lactis* MG1363 conteniendo los vectores pAKmRFPGFP-RMAF- $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$ (A y B) y pAKmRFPGFP-RLRC-RMAF- $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$ (C y D). CDM, medio químicamente definido; CDM-i, CDM sin isoleucina (condiciones de inducción); CDM-r, CDM con casitona (condiciones de represión).

5.3.5. Efecto de la modificación de las secuencias nucleotídicas de la caja CodY y de la estructura repetida inversa presentes en la región promotora $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ sobre la expresión de GFP y mRFP en tiempo real durante el crecimiento de *L. lactis*

El efecto de la modificación de las secuencias nucleotídicas (Fig. 5.3) de la presunta caja CodY y de la estructura repetida inversa, presentes en la región promotora divergente $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ sobre la regulación de la transcripción del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730, fue evaluado mediante la comparación de los ratios (RFU/DO) de expresión simultánea de fluorescencia de GFP y mRFP en *E. coli* DH5 α y *L. lactis* MG1363 conteniendo los vectores derivados de la fusión transcripcional del vector pAKmRFPGFP con la región promotora con modificaciones en la secuencia de nucleótidos. Los ratios de expresión de GFP y mRFP obtenidos por esas estirpes conteniendo las regiones modificadas fueron comparados con aquellos obtenidos por las mismas estirpes con la región promotora original $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$.

Al comparar los resultados obtenidos con la región promotora original (Fig. 5.11), se observó que las tres mutaciones llevadas a cabo en $P_{RmaF-RlrC-P_{KivD}}$ afectaron negativamente a la expresión relativa de mRFP, siendo este efecto más acusado en *L. lactis* MG1363 que en *E. coli* DH5 α . La mutación llevada a cabo sobre la secuencia nucleotídica de la caja CodY repercutió en *L. lactis* MG1363 en una marcada reducción de la expresión de mRFP, a la vez que en un incremento de la expresión de GFP, ambos resultados comparados con los obtenidos con la secuencia sin mutar. Es decir, la mutación de la secuencia de la caja CodY reprimió la actividad del promotor P_{KivD} y activó (o impidió la represión de) la expresión del promotor $P_{RmaF-RlrC}$. Resultados equivalentes se obtuvieron con *E. coli* DH5 α , aunque las diferencias en expresión fueron menores.

Por otro lado, las modificaciones en la secuencia repetida inversa provocaron prácticamente la nula actividad de los promotores $P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD} en *L. lactis*. Este efecto fue menos evidente en *E. coli*, donde se observaron resultados equivalentes a la fluorescencia observada cuando la región promotora no estaba mutada.

La mutación conjunta en las secuencias de la presunta caja CodY y en la secuencia repetida inversa se tradujo en una ausencia de actividad de los promotores en ambas especies, a la vista de la nula o mínima expresión de mRFP y GFP en *L. lactis* y *E. coli*.

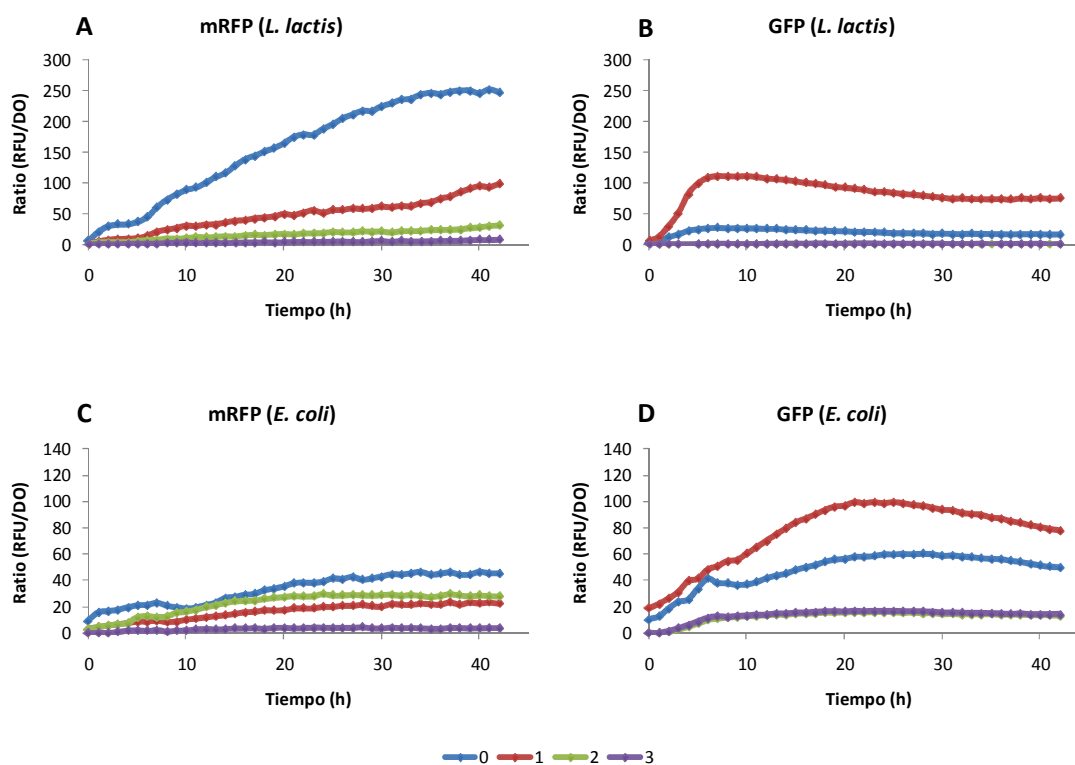


Figura 5.11. Efecto de la modificación de las secuencias nucleotídicas de la caja CodY y de la estructura repetida inversa presentes en la región promotora $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$. Ratios de expresión de fluorescencia (RFU/DO) de mRFP y GFP durante el crecimiento en medio químicamente definido de *L. lactis* MG1363 (A y B) y *E. coli* DH5 α (C y D) conteniendo los vectores pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$ (región original) (0), pAKmRFPGFP-(M1) $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$ (caja CodY mutada) (1), pAKmRFPGFP-(M2) $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$ (secuencia repetida inversa mutada) (2) y pAKmRFPGFP-(M3) $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$ (caja CodY y secuencia repetida inversa mutadas) (3).

Con objeto de comprobar si el contenido en péptidos y aminoácidos en el medio de crecimiento seguía teniendo un efecto regulador sobre la expresión de la región promotora con modificaciones en la caja CodY, se creó a *L. lactis* MG1363[pAKmRFPGFP-(M1) $P_{RmaF-Rlrc-P_{KivD}}$] en condiciones de inducción (CDM sin isoleucina) y de represión (CDM con casitona). Los ratios de expresión de GFP y mRFP obtenidos durante el crecimiento fueron comparados con los obtenidos en

condiciones normales de crecimiento en CDM (Fig. 5.12). La expresión de mRFP incrementó en condiciones inductoras y se redujo ligeramente en condiciones represoras, aunque los valores de fluorescencia fueron marcadamente inferiores a los observados para la región promotora intacta (Fig. 5.7 A y C). La expresión de GFP se mantuvo relativamente elevada en condiciones represoras, pareciendo verse menos afectada la expresión del promotor $P_{RmaF-RlrC}$ por las condiciones de crecimiento al mutar la presunta caja CodY

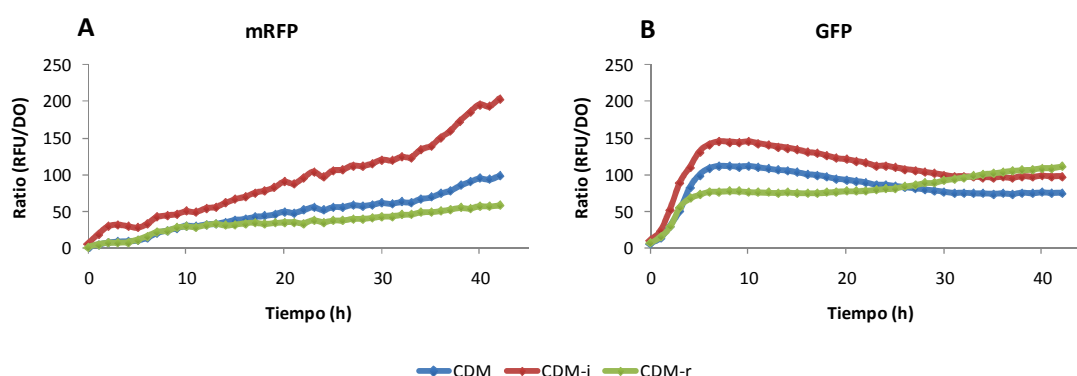


Figura 5.12. Efecto del contenido de aminoácidos y péptidos sobre la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}$ con modificaciones en la secuencia nucleotídica de la caja CodY. Ratios de expresión de fluorescencia (RFU/DO) de mRFP (A) y GFP (B) durante el crecimiento de *L. lactis* MG1363 conteniendo el vector $pAKmRFPGFP-(M1)P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}$. CDM, medio químicamente definido; CDM-i, CDM sin isoleucina (condiciones de inducción); CDM-r, CDM con casitona (condiciones de represión).

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1. Empleo de vectores de fusión transcripcional con mRFP y GFP como marcadores de expresión

El uso de proteínas autofluorescentes con espectros de excitación y emisión suficientemente separados en una misma célula ha permitido evaluar simultáneamente aspectos biológicos *in situ*, tales como expresión génica o procesos metabólicos bacterianos (Larrazar *et al.*, 2005). Los espectros de excitación y emisión

de GFP y mRFP no solapan entre sí, lo que hace posible su detección en numerosas aplicaciones biológicas (Tecon *et al.*, 2009). La proteína GFP es el marcador biológico más utilizado en biotecnología y ha sido optimizada para su empleo en diferentes organismos (Patterson *et al.*, 1997). Por otro lado, la proteína fluorescente roja ha sido utilizada exitosamente en estudios recientes (Malone *et al.*, 2009; Lagendijk *et al.*, 2010). Además, en el presente trabajo se ha empleado el gen que codifica la proteína autofluorescente roja mCherry (mRFP) cuya secuencia nucleotídica ha sido optimizada en codones para su expresión en bacterias lácticas.

Los vectores de fusión transcripcional desarrollados en este trabajo contienen el gen *mrfp* (pAKmRFP) o los genes *mrfp* y *gfp* en orientación divergente (pAKmRFPGFP). Es importante remarcar que esos vectores incluyen un origen de replicación funcional en *L. lactis* y *E. faecalis* (replicón pCT1138), así como otro para *E. coli* (replicón p15A). Además, contienen una región de clonación múltiple con al menos un sitio de restricción para la inserción de fragmentos de ADN, y el gen *ermC* (que codifica para una proteína de resistencia a la eritromicina) como marcador para la selección de transformantes. Por lo tanto, los plásmidos vectores pAKmRFP y pAKmRFPGFP pueden ser utilizados para caracterizar promotores uni- y bidireccionales o divergentes, respectivamente, tanto en *L. lactis* y *E. faecalis* como en *E. coli*. Para corroborar esta afirmación, se emplearon el promotor silvestre P_x del operón *malXCD* de *S. pneumoniae* R61 (Nieto *et al.*, 2001) y la región promotora anterior al gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 (De la Plaza *et al.*, 2009) para evaluar a tiempo real la expresión de GFP y mRFP durante el crecimiento de *L. lactis* MG1363, *E. faecalis* JH2-2 and *E. coli* DH5 α conteniendo esos plásmidos vectores. La expresión de mRFP en clones conteniendo el vector pAKmRFP- P_x fue fácilmente detectada por la coloración adquirida tanto en las placas de agar como en las preparaciones microscópicas utilizadas en los ensayos de adhesión a células humanas. Esto, unido al hecho de que mRFP evolucionara en paralelo al crecimiento en las tres estirpes, confirmó que mRFP es un excelente marcador de expresión. Por otro lado, la región promotora que comprende los promotores divergentes P_{KivD} y $P_{RmaF-Rlrc}$ sirvió para demostrar la aptitud de pAKmRFPGFP como vector de fusión transcripcional para promotores bidireccionales o divergentes. En este sentido, los resultados de fluorescencia

obtenidos para GFP y mRFP durante el crecimiento de *L. lactis* MG1363, *E. faecalis* JH2-2 y *E. coli* DH5 α , conteniendo el vector pAKmRFPGFP-P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}, fueron heterogéneos (Fig. 5.6), a la vista de las diferencias de expresión encontradas entre GFP y mRFP. Esto sugiere que la región P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD} tiene un comportamiento constitutivo en *E. coli* y regulable en *L. lactis* y *E. faecalis*. Además, los resultados de expresión espectrofluorométricos y microscópicos de GFP y mRFP correlacionaron con las coloraciones obtenidas por las colonias en placa.

Hasta el momento, ningún vector de expresión para bacterias Gram-positivas conteniendo la proteína mRFP como marcador está disponible comercialmente. Por otro lado, en la mayoría de trabajos donde se han caracterizado promotores bidireccionales o divergentes, se han usado como marcadores genes que codificaban para actividades enzimáticas o la combinación de estos con GFP (Parry *et al.*, 1994; Jiwaji *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Partow *et al.*, 2010). En esos estudios, la evaluación de las actividades enzimáticas fue evaluada de forma discontinua y no simultánea con el crecimiento, suponiendo una desventaja respecto a lo descrito en el presente trabajo.

5.4.2. Caracterización de la regulación de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730

El gen *kivD* codifica para una enzima clave en *L. lactis* implicada en la formación de aldehídos a partir de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) (De la Plaza *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2005a; Yvon, 2006). Esta enzima es poco frecuente en bacterias lácticas (De la Plaza *et al.*, 2006) y su presencia en *L. lactis* se ha asociado a cepas de origen no lácteo (Smit *et al.*, 2004a). De la Plaza *et al.* (2004) caracterizaron la enzima KivD de *L. lactis* IFPL730, y De la Plaza *et al.* (2009) revelaron algunos aspectos de la expresión de su gen codificante *kivD*, mostrando que su transcripción era regulada por el nivel de isoleucina y péptidos contenidos en el medio de crecimiento, probablemente en un proceso mediado por el regulador del metabolismo del nitrógeno CodY. En el presente trabajo se ha profundizado en el estudio de la caracterización de los mecanismos genéticos relacionados con la regulación de la

región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730. Para ello, se empleó la estrategia de fusión transcripcional de esa región al vector pAKmRFPGFP con las proteínas fluorescentes GFP y mRFP como marcadores de expresión en *L. lactis* y en un organismo heterólogo para esa región como *E. coli*.

La región anterior del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 posee dos promotores con polaridad divergente, uno (P_{KivD}) en dirección al gen *kivD* y el otro ($P_{RmaF-RlrC}$) en la dirección opuesta delante de un operón compuesto por los genes *rmaF* y *rlrC*. Este estudio ha demostrado que la fuerza del promotor P_{KivD} en *L. lactis* es superior a la de $P_{RmaF-RlrC}$, al observarse una mayor expresión de mRFP durante el crecimiento de *L. lactis* MG1363 conteniendo el plásmido con la región promotora pAKmRFPGFP- $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} . Este hecho se reafirmó mediante la clonación de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} en el plásmido pAKmRFPGFP en el sentido contrario, quedando la expresión de GFP controlada por P_{KivD} y obteniendo unos resultados equivalentes a los hallados con mRFP controlada por P_{KivD} . Esto sirvió además para comprobar que la expresión diferencial encontrada entre mRFP y GFP no se debía a la mayor sensibilidad al pH que presenta GFP (Fernández de Palencia *et al.*, 2000).

Cuando se analizaron condiciones del crecimiento inductoras (ausencia de isoleucina) y represoras (aminoácidos sustituidos por casitona) sobre la región promotora en *L. lactis* se encontraron diferencias en la expresión de las proteínas fluorescentes. Así, la ausencia de isoleucina provocó una inducción de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} y una represión por el contenido en péptidos en el medio. Esto concuerda con los resultados de expresión del gen *kivD* y de actividad α -cetoácido decarboxilasa encontrados por De la Plaza *et al.* (2009) en *L. lactis* IFPL730 crecido en esas condiciones.

Se ha demostrado que las proteínas reguladoras RmaF y RlrC, cuyos genes codificantes *rmaF* y *rlrC* están situados en la dirección opuesta al gen *kivD* están implicadas en la regulación de la expresión de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} en *L. lactis*. Las dos proteínas estarían implicadas en una regulación negativa del promotor P_{KivD} , dado que la expresión de mRFP fue marcadamente menor, mientras que la proteína RmaF participaría en la activación del promotor $P_{RmaF-RlrC}$. El significado

biológico de estas observaciones podría ser que *L. lactis* reduzca la expresión de *kivD*, a conveniencia por reajustes en el metabolismo de aminoácidos, en proporción al aumento de la expresión de los genes reguladores. Además, RmaF y RlrC autoregularían su propia síntesis para, a su vez, regular a *kivD*. Para determinar si en la regulación por RmaF y RlrC estaba implicado el contenido de aminoácidos y péptidos en el medio de crecimiento, se analizó la expresión de los marcadores fluorescentes en condiciones de inducción y represión. No se encontraron evidencias que confirmaran la influencia del contenido nitrogenado en el medio sobre la regulación por RmaF y RlrC, al encontrarse el mismo perfil de inducción y represión observado con la región promotora sin genes reguladores. Varios estudios han mostrado en *L. lactis* el hecho de que una proteína reguladora necesita de un estímulo celular para su actuación. Se ha mostrado que el regulador CodY actúa en respuesta al cúmulo de BCAAs (Den Hengst *et al.*, 2005b; Guedon *et al.*, 2005). Golic *et al.* (2005) mostraron que la proteína CmbR, de la familia de reguladores LysR (al igual que RlrC), necesitaba la estimulación de O-acetil-L-serina para la activación del operón *metC-cysK* relacionado con el metabolismo de aminoácidos azufrados. Por otro lado, el regulador GlnR era activado en respuesta al contenido extracelular de amonio y glutamina (Larsen *et al.*, 2006). En nuestro caso, es probable que el mecanismo de regulación por RmaF y RlrC responda a otros estímulos celulares distintos a los ensayados.

El análisis detallado de la secuencia nucleotídica de la región promotora $P_{RmaF-RlrC}-P_{KivD}$ refleja la presencia de una secuencia de reconocimiento para la unión con el regulador CodY (caja CodY) entre las regiones -10 y -35, además de una secuencia repetida inversa cerca de la región -35. Las mutaciones realizadas sobre la secuencia nucleotídica de la caja CodY y la secuencia repetida inversa provocó tanto en *L. lactis* como *E. coli*, una inhibición de la actividad del promotor P_{KivD} , lo que demuestra que estas estructuras son necesarias para la óptima expresión del gen *kivD*. Al estudiar las mutaciones por separado, se observó que la mutación de la secuencia de la caja CodY reprimió la actividad del promotor P_{KivD} y activó la del promotor $P_{RmaF-RlrC}$. Las modificaciones en la caja CodY presumiblemente modificara la aptitud de los promotores para su expresión. Por otro lado, los cambios en la secuencia repetida

inversa provocaron un descenso en la actividad de ambos promotores ($P_{RmaF-RlrC}$ y P_{KivD}), siendo marcadamente superior en *L. lactis* que en *E. coli*.

La presencia de una caja CodY en la región anterior de un gen implica que el regulador CodY pueda unirse a esa región afín y ejercer su actividad represora en respuesta al contenido en BCAAs (Den Hengst *et al.*, 2005b). En base a esto, era esperado que las condiciones tanto de inducción (ausencia de isoleucina en el medio de crecimiento) como de represión (presencia de casitona en el medio de crecimiento) no afectaran a la expresión de la región promotora que presentaba mutaciones en la secuencia de reconocimiento del regulador CodY. Los resultados obtenidos demostraron que a pesar de anular el sitio de reconocimiento de CodY, el contenido de aminoácidos y péptidos continuaba afectando a la expresión de los promotores. Algunos estudios en *Bacillus subtilis* han mostrado diferentes sitios de unión para CodY en regiones promotoras (Slack *et al.*, 1995; Serror y Sonenshein, 1996), pudiéndose unir a regiones con un bajo nivel de afinidad (Joseph *et al.*, 2005). Además, se observó en *L. lactis* que CodY podía unirse a múltiples sitios en las regiones promotoras de los genes *gltA*, *serC* y del propio gen *codY*, aparte de en la propia caja CodY (Den Hengst *et al.*, 2005b). La secuencia repetida inversa de la región $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} , además de ser necesaria para la expresión del gen *kivD*, podría estar implicada en la regulación mediada por CodY, en concordancia con lo encontrado por varios autores (Marugg *et al.*, 1996; Gajic, 2003). En esos trabajos, se llevaron a cabo análisis de expresión con mutaciones en la región situada entre los genes *prrP* y *prrM*, que codifican para proteinasas, en *L. lactis* SK11. Se encontró que tanto la presencia de una caja CodY como de una secuencia repetida inversa en esa región eran necesarias para la regulación de la actividad del promotor dependiente del contenido en péptidos y aminoácidos. Además, en *B. subtilis* se propuso que CodY podría reconocer y unirse a estructuras de ADN ricas en A+T (Serror y Sonenshein, 1996), como la secuencia repetida inversa presente en la región $P_{RmaF-RlrC}$ - P_{KivD} . Por todo ello, y teniendo en cuenta los resultados encontrados, la regulación del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730 mediada por CodY sería dependiente tanto del contenido en BCAAs en el medio de crecimiento como de la presencia de la estructura repetida inversa.

5.5. CONCLUSIONES FINALES DEL CAPÍTULO

La novedad científica de este trabajo radica en que por primera vez se muestra la construcción de vectores de expresión conteniendo dos proteínas autofluorescentes que pueden ser usados para caracterizar promotores divergentes en bacterias lácticas. Aunque esos vectores sean útiles herramientas de clonaje, en tanto que pueden ser propagados en *E. coli*, han sido especialmente diseñados para estudiar la expresión génica y su regulación en *L. lactis*. La construcción de estos vectores nos ha permitido evaluar los mecanismos de regulación transcripcional que tienen lugar a partir de la región promotora compuesta por los promotores P_{KivD} y $P_{RmaF-RlrC}$ y de las proteínas reguladoras RmaF y RlrC. Por un lado, la acción conjunta de RmaF y RlrC reprime la expresión de la región promotora, aunque el mecanismo de regulación es independiente del contenido en aminoácidos y péptidos en el medio de crecimiento. Por otro lado, tanto la presencia de una caja CodY como de una secuencia repetida inversa en la región promotora están implicadas en la regulación mediada por CodY, y son además indispensables para la expresión del gen *kivD* en *L. lactis*.

Conclusiones

PRIMERA.

La carencia o ausencia de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en el medio de crecimiento de *Lactococcus lactis* IFPL730 provoca un aumento de la expresión de genes relacionados con el catabolismo de aminoácidos y formación de compuestos volátiles (*araT*, *bcaT*, *kivD*, *ytjE* y *panE*), probablemente asociado al mecanismo de regulación mediado por el regulador global del metabolismo del nitrógeno CodY. Los genes *bcaT* y *kivD* presentaron la mayor expresión relativa en ausencia de isoleucina y carencia de valina.

SEGUNDA.

El contenido en BCAAs en el medio de crecimiento determina cambios en el perfil de compuestos volátiles generados por *L. lactis* IFPL730, en parte, por consecuencia directa de los cambios ocurridos en la expresión génica. El aumento de expresión de los genes *bcaT* y *kivD* en ausencia de isoleucina o carencia de valina se reflejó en un aumento en la formación de los compuestos 3-metilbutanal y 3-metilbutanol.

TERCERA.

El análisis por hibridación genómica comparativa (CGH) mostró la variabilidad genética existente entre *L. lactis* IFPL730, *L. lactis* IL1403 y *L. cremoris* SK11, revelando una diversidad de regiones codificantes y regiones intergénicas. Además, con el análisis de la identidad de secuencia se comprobó que el genoma de *L. lactis* IFPL730 está más próximo al de *L. lactis* IL1403 que al de *L. cremoris* SK11.

CUARTA.

Se ha mostrado la respuesta transcriptómica de dos cepas de *L. lactis* (IL1403 e IFPL730) a la carencia de isoleucina sobre ciertas rutas del metabolismo de

aminoácidos. Por un lado, se ha observado una amplia variabilidad en la expresión de genes implicados en la hidrólisis de péptidos y el transporte de péptidos y aminoácidos en respuesta a la ausencia de isoleucina. Por otro lado, se ha demostrado la diferente expresión entre las dos estirpes de *L. lactis* estudiadas de genes implicados en la biosíntesis de isoleucina ante la falta de este aminoácido en el medio de crecimiento y en diferentes estados celulares.

QUINTA.

Se ha observado que existe un mecanismo complejo de regulación participando en la respuesta de *L. lactis* frente a la carencia de isoleucina, implicando a varios reguladores como CodY y CcpA y conectando el metabolismo del nitrógeno y del carbono.

SEXTA.

Se ha construido por primera un vector de expresión que contiene dos proteínas autofluorescentes (mRFP y GFP) que puede ser usado para caracterizar regiones promotoras divergentes en bacterias lácticas. Este vector ha sido especialmente diseñado para estudiar la expresión génica y su regulación en *L. lactis*.

SÉPTIMA.

Los genes reguladores RmaF y RlrC reprimen la expresión de la región promotora del gen *kivD* de *L. lactis* IFPL730. Su mecanismo de regulación es independiente del contenido en aminoácidos y péptidos en el medio de crecimiento. Tanto la presencia de una secuencia de reconocimiento para la unión con el regulador CodY (caja CodY) entre las regiones -10 y -35 del promotor P_{KivD} , como la de una secuencia repetida inversa cerca de la región -35 del promotor $P_{RmaF-RlrC}$ son necesarias para la expresión del gen *kivD*. Ambas estructuras están implicadas en la regulación mediada por CodY y el contenido en BCAAs en el medio de crecimiento.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Alguel, Y., Leung, J., Singh, S., Rana, R., Civiero, L., Alves, C., Byrne, B. (2010). New tools for membrane protein research. *Curr Protein Pept Sc.* 11: 156-165.
- Alting, A.C., Engels, W.J.M., van Schalkwijk, S., Exterkate, F.A. (1995) Purification and characterization of cystathionine β -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese. *Appl Environ Microbiol.* 61: 4037–4042.
- Amárita, F., Fernández-Esplá, D., Requena, T., Peláez, C. (2001) Conversion of methionine to methional by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 204: 189–195.
- Amárita, F., Yvon, M., Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J., Bonnarme, P. (2004) Identification and functional analysis of the gene encoding methionine- γ -lyase in *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.* 70: 7348–7354.
- Ardo, Y. (2006) Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnol Adv.* 24: 238-242.
- Auger, S., Yuen, W.H., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. (2002) The *metIC* operon involved in methionine biosynthesis in *Bacillus subtilis* is controlled by transcription antitermination. *Microbiology.* 148: 507-518.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., de Jong, C., Wouters J.T.M., Smit, G. (1999) Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *Int Dairy J.* 9: 725-735.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2000) Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *Int Dairy J.* 10: 169-179.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Brumenberg, P., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2003) Starter culture development for improving the flavour of Proosdij-type cheese. *Int Dairy J.* 13: 159-168.

- Ayad, E.H.E. (2008) Biodiversity of lactococci in flavor formation for dairy products innovation. Alex J Fd Sci & Technol. Special volume conference pp: 31-43.
- Banks, J.M., Yvon, M., Gripon, J.C., de la Fuente, M.A., Brechany, E.Y., Williams, A.G., Muir, D.D. (2001) Enhancement of amino acid catabolism in Cheddar cheese using α -ketoglutarate: Amino acid degradation in relation to volatile compounds and aroma character. Int Dairy J. 11: 235–243.
- Barbieri, G., Bolzoni, I., Careri, M., Parolari, G., Spagnoli, S., Virgili, R. (1994) Study of the volatile fraction of Parmesan cheese. J Agr Food Chem. 42: 1170–1176.
- Bayjanov, J.R., Wels, M., Starrenburg, M., van Hylckama Vlieg, J.E., Siezen, R.J., Molenaar, D. (2009) PanCGH: a genotype-calling algorithm for pangenome CGH data. Bioinformatics. 25: 309–314.
- Bernard, N., Johnson, K., Ferain, T., Garmyn, D., Hols, P., Holbrook, J.J., Delcour, J. (1994) NAD⁺-dependant d-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase of *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus*. Gene cloning and enzyme characterization. Eur J Biochem. 224: 439–446.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403. Genome Res. 11: 731–753.
- Bonnarme, P., Amarita, F., Chambellon, E., Semon, E., Spinnler, H.E., Yvon, M. (2004) Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from L-methionine by *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol Lett. 236: 85-90.
- Bruinenberg, P.G., de Roo, G., Limsowtin, G.K.Y. (1997) Purification and characterization of cystathionine γ -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11: possible role in flavor compound formation during cheese maturation. Appl Environ Microbiol. 63: 561–566.
- Buist, G., Venema, G., Kok, J. (1998) Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. J Bacteriol. 180: 5947-5923.

- Candy, J.M., Duggleby, R.G. (1998) Structure and properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme. *Biochim Biophys. Acta* 1385: 323–338.
- Chambellon, E., Yvon, M. (2003) CodY-regulated aminotransferases AraT and BcaT play a major role in the growth of *Lactococcus lactis* in milk by regulating the intracellular pool of amino acids. *Appl Environ Microbiol.* 69: 3061–3068.
- Chambellon, E., Rijnen, L., Lorquet, F., Gitton, C., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Wouters, J. A., Yvon, M. (2009) The D-2-hydroxyacid dehydrogenase incorrectly annotated PanE is the sole reduction system for branched-chain 2-keto acids in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 191: 873-881.
- Chammas, G.I., Saliba, R., Corrieu, G., Béal, C. (2006) Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *Int J Food Microbiol.* 110: 52-61.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-534, 536-537.
- Chopin, A. (1993) Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12: 21-38.
- Chou, L.S., Weimer, B.C., Cutler, R. (2001) Relationship of arginine and lactose utilization by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ML3. *Int Dairy J.* 11: 253-258.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 217-246.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A. (2005) Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends Biotechnol.* 23: 605–613.
- Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Novak, L., Lindley, N.D., Loubiere, P. (1995) Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol.* 79: 108–116.

- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int Dairy J.* 13: 841-866.
- Conrad F.D., Owen, C.M., Patterson, J. (2004) Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensm Wiss Technol.* 37: 139-154.
- Courtin, P., Nardi, M., Wegmann, U., Joutsjoki, V., Ogier, J.C., Gripon, J.C., Palva, A., Henrich, B., Monnet, V. (2002) Accelerating cheese proteolysis by enriching *Lactococcus lactis* proteolytic system with lactobacilli peptidases. *Int Dairy J.* 12: 447–454.
- Crow, V.L., Coolbear, T., Gopal, P.K., Martley, F.G., McKay, L.L., Riepe, H. (1995) The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int Dairy J.* 5: 855-875.
- Curioni, P.M.G., Bosset, J.O. (2002) Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography—olfactometry. *Int Dairy J.* 12: 959–984.
- De la Plaza, M., Fernández de Palencia, P., Peláez, C., Requena, T. (2004) Molecular characterization of α -ketoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 238: 367–374.
- De la Plaza, M., Chambellon, E., Tanous, C., Neviani, E., Peláez, C., Yvon, M. (2005) Comparison of glutamate dehydrogenase genes of *L. lactis*, *Lb. plantarum* and *S. thermophilus* and their impact on amino acid catabolism (E 007). 8th Symposium on lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications. Egmond aan Zee, Países Bajos.
- De la Plaza, M., Rodríguez, A., Fernández de Palencia, P., Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Requena, T. (2006) Discrepancies between the phenotypic and genotypic characterization of *Lactococcus lactis* cheese isolates. *Lett Appl Microbiol.* 43: 637–644.

- De la Plaza, M., Peláez, C., Requena, T. (2009) Regulation of α -ketoisovalerate decarboxylase expression in *Lactococcus lactis* IFPL730. J Mol Microbiol Biotechnol. 17: 96-100.
- Delorme, C., Godon, J.J., Ehrlich, S.D., Renault, P. (1993) Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: histidine biosynthesis. J Bacteriol. 175: 4391-4399.
- Delorme, C., Ehrlich, S.D., Renault, P. (1999) Regulation of expression of the *Lactococcus lactis* histidine operon. J Bacteriol. 181: 2026–2037.
- Den Hengst, C.D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O.P., Kok, J. (2005a) Probing direct interactions between CodY and the *oppD* promoter of *Lactococcus lactis*. J Bacteriol. 187: 512–521.
- Den Hengst, C.D., van Hijum, S.A.F.T., Geurts, J.M.W., Nauta, A., Kok, J., Kuipers, O.P. (2005b) The *Lactococcus lactis* CodY regulon: identification of a conserved *cis*-regulatory element. J Biol Chem. 280: 34332–34342.
- Den Hengst, C.D., Groeneveld, M., Kuipers, O.P., Kok, J. (2006) Identification and functional characterization of the *Lactococcus lactis* CodY-regulated branched-chain amino acid permease BcaP (CtrA). J Bacteriol. 188: 3280–3289.
- Detmers, F.J., Kunji, E.R., Lanfermeijer, F.C., Poolman, B., Konings, W.N. (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. Biochemistry. 37:16671–16679.
- Dias, B., Weimer, B.C. (1998a) Purification and characterization of L-methionine γ -lyase from *Brevibacterium linens* BL2. Appl Environ Microbiol. 64: 3327–3331.
- Dias, B., Weimer, B.C. (1998b). Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacilli, and brevibacteria. Appl Environ Microbiol. 64: 3320–3326.
- Dobric, N., Limsowtin, G.K., Hillier, A.J., Dudman, N.P., Davidson, B.E. (2000) Identification and characterization of a cystathionine β/γ -lyase from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363. FEMS Microbiol Lett. 182: 249–254.

- Doeven, M.K, Kok, J., Poolman, B. (2005) Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol Microbiol.* 57:640–649.
- Dressaire, C., Redon, E., Milhem, H., Besse, P., Loubière, P., Cocaigh-Bousquet, M. (2008) Growth rate regulated genes and their wide involvement in the *Lactococcus lactis* stress responses. *BMC Genomics.* 9: 343-356.
- Dunn, H.C., Lindsay, R.C. (1985) Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of Cheddar cheese. *J Dairy Sci.* 68: 2859–2874.
- Epshtein, V., Mironov, A.S., Nudler, E. (2003) The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 5052-5056.
- Ferchichi, M., Hemme, D., Nardi, M., Pamboukgjian, N. (1985) Production of methanethiol from methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *J Gen Microbiol.* 131: 715–723.
- Fernandez de Palencia, P., Nieto, C., Acebo, P., Espinosa, M., Lopez, P. (2000) Expression of green fluorescent protein in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 183: 229-234.
- Fernández de Palencia, P., De la Plaza, M., Amárita, F., Requena, T., Peláez, C. (2006) Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enz Microbiol Technol.* 38: 88–93.
- Fernández, L., Beerthuyzen, M.M., Brown, J., Siezen, R.J., Coolbear, T., Holland, R., Kuipers, O.P. (2000a) Cloning, characterization, controlled overexpression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 66 :1360-1368.
- Fernández, M., van Doesburg, W., Rutten, G.A., Marugg, J.D., Alting, A.C., van Kranenburg, R., Kuipers, O.P. (2000b) Molecular and functional analyses of the *metC* gene of *Lactococcus lactis*, encoding cystathionine β -lyase. *Appl Environ Microbiol.* 66: 42–48.

- Fernández, M., Kleerebezem, M., Kuipers, O.P., Siezen, R.J. and van Kranenburg, R. (2002). Regulation of the *metC-cysK* operon, involved in sulfur metabolism in *Lactococcus lactis*. J Bacteriol. 184: 82-90.
- Fernández, M., Zúñiga, M. (2006) Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. Rev Microbiol. 32: 155-183.
- Fernandez-Esplá, M.D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. (2000) *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. Appl Environ Microbiol. 66: 4772–4778.
- Fiedler, S., Wirth, R. (1991) Transformation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by electroporation, p. 301. In G. M. Dunny, P. P. Clearly, and L. L. McKay (ed.), Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci, and enterococci. ASM Press, Washington, DC.
- Fontecha, J., Pelaéz C., Juárez, M., Requena, T., Gómez, C., Ramos, M. (1990) Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. J Dairy Sci. 73: 1150-1157.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2000) Fundamentals of Cheese Science. AN Aspen Publishers Inc., USA.
- Fox, P.F., Wallace, J.M., Morgan, S., Lynch, C.M., Niland, E.J., Tobin, J. (1996) Acceleration of cheese ripening. Anton van Lee. 70: 271–297.
- Fox, P.F., Wallace, J.M. (1997) Formation of flavor compounds in cheese. Adv Appl Microbiol. 45: 17-85.
- Frees, D., Varmanen, P., Ingmer, H. (2001) Inactivation of a gene that is highly conserved in gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*. Mol Microbiol. 41: 93–103.
- Frommer, W.B., Davidson, M.W., Campbell, R.E. (2009) Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. Chem Soc Rev. 38: 2833–2841.

- Fuchs, R.T., Grundy, F.J. and Henkin, T.M. (2006). The S_{MK} box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. *Nat Struct Mol Biol.* 13: 226-233.
- Fukuda, H., Arai, M., Kuwajima, K. (2000) Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant. *Biochemistry* 39: 12025–12032.
- Gajic, O. (2003) Relationships between MDR proteins, bacteriocin production and proteolysis in *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral, Universidad de Groningen, Groningen, Países Bajos.
- Ganesan, B., Seefeldt, K., Koka, R.C., Dias, B., Weimer, B.C. (2004a) Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli. *Int Dairy J.* 14:237–246.
- Ganesan, B., Seefeldt, K., Weimer, B.C. (2004b) Fatty acid production from amino acids and alpha-keto acids by *Brevibacterium linens* BL2. *Appl Environ Microbiol.* 70: 6385–6393.
- Ganesan, B., Stuart, M.R., Weimer, B.C. (2007) Carbohydrate starvation causes a metabolically active but nonculturable state in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 73: 2498-2512.
- Ganesan, B., Weimer, B.C. (2007) Amino acid metabolism in relationship to cheese flavor development. In Weimer, B.C. (ed): *Improving the flavor of cheese*. Woodhead Publishing & CRC Press, USA. pp: 70-101.
- Gao, S., Oh, D.H., Broadbent, J.R., Johnson, M.E., Weimer, B.C. y Steele, J.L. (1997) Aromatic amino acid catabolism by lactococci. *Lait.* 77: 371–381.
- Gao, S., Steele, J.L. (1998) Purification and characterization of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. *J Food Biochem.* 22: 197–211.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V. (2000) Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl Environ Microbiol.* 66: 5128-5133.

- Garcia-Cayuela, T., Tabasco, R., Pelaez, C., Requena, T. (2009) Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. *Int Dairy J.* 19: 405–409.
- Garde, S., Avila, M., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. (2006) Proteolysis of Hispanico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. *J Dairy Sci.* 89: 840–849.
- Gasson, M.J. (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol.* 154: 1-9.
- Gaudu, P., Lamberet, G., Poncet, S., Gruss, A. (2003) CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol.* 50: 183-92.
- Geoffroy M.C., Guyard, C., Quatannens, B., Pavan, S., Lange, M., Mercenier, A. (2000). Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl Environ Microbiol.* 66: 383-391.
- Ghim, C.M.G., Lee, S.K., Takayama, S., Mitchell, R.J. (2010) The art of reporter proteins in science: past, present and future applications. *BMB Reports.* 43: 451-460.
- Gitton, C., Meyrand, M., Wang, J., Caron, C., Trubuil, A., Guillot, A., Mistou, M.Y. (2005) Proteomic signature of *Lactococcus lactis* NCDO763 cultivated in milk. *Appl Environ Microbiol.* 71: 7152–7163.
- Gobetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizello, G. (2007) The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. In Weimer, B. C. (ed): *Improving the flavor of cheese*. Woohhead Publishing & CRC Press, USA. pp: 121-156.
- Godon, J.J., Chopin, M.C., Ehrlich, S.D. (1992) Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Bacteriol.* 174: 6580-6589.
- Godon, J.J., Delorme, C., Bardowski, J., Chopin, M.C., Ehrlich, S.D, Renault, P, (1993) Gene inactivation in *Lactococcus lactis* –branched-chain amino acid biosynthesis. *J Bacteriol.* 175: 4383–4390.

- Golic, N., Schliekelmann, M., Fernández, M., Kleerebezem, M., van Kranenburg, R. (2005) Molecular characterization of the CmbR activator-binding site in the *metC-cysK* promoter region in *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. 151: 439-46.
- Goupil-Feuillerat, N., Coccagn-Bousquet, M., Godon, J.J., Ehrlich, S.D., Renault, P. (1997). Dual role of alpha-acetolactate decarboxylase in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Bacteriol*. 179: 6285–6293.
- Goupil-Feuillerat, N, Corthier, G., Godon, J.J., Ehrlich, S.D., Renault, P. (2000) Transcriptional and translational regulation of alpha-acetolactate decarboxylase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J Bacteriol*. 182: 5399-408.
- Guédon, E., Serror, P., Ehrlich S.D., Renault, P., Delorme, C. (2001a) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol*. 40: 1227-1239.
- Guédon, E., Jamet, E., Renault, P. (2001b) Gene regulation in *Lactococcus lactis*: the gap between predicted and characterized regulators. *Anton van Lee*. 82: 93–112.
- Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, D., Delorme, C. (2001c) Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J Bacteriol* 183: 3614–3622.
- Guédon, E., Sperandio, B.C., Pons, M., Ehrlich, S.D., Renault, P. (2005) Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology*. 151: 3895–3909.
- Gummalla, S., Broadbent, J. R. (1999) Tryptophan catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* cheese flavor adjuncts. *J Dairy Sci*. 82: 2070–2077.
- Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, E., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B. (2008) alpha-Ketoglutarate biosynthesis in wild and industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Lett Appl Microbiol*. 47: 202-207.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*, p. 109-135. In D. M. Glover (ed.), *DNA cloning: a practical approach*, vol. 1. IRL Press, Oxford.

- Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D., Yvon, M. (2004) Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl Environ Microbiol.* 70: 3855–3861.
- Hickey, M.W., Hillier, A.J., Jago, G.R. (1983) Enzymic activities associated with lactobacilli in dairy products. *Aust J Dairy Technol.* 38: 154–157.
- Hochuli, M., Patzelt, H., Oesterhelt, D., Wuthrich, K., Szyperski, T. (1999) Amino acid biosynthesis in the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *J Bacteriol.* 181: 3226–3237.
- Holo, H., Nes, I.F. (1989) High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl Environ Microbiol.* 55: 3119–3123.
- Hughenoltz, J., van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2007) Monitoring cheese ripening: new developments. In Weimer, B. C. (ed): *Improving the flavor of cheese*. Woodhead Publishing & CRC Press, USA. pp: 352–369.
- Hullo, M.F., Auger, S., Soutourina, O., Barzu, O., Yvon, M., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. (2007) Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. *J Bacteriol.* 189: 187–97.
- Hummel, W., Schütte, H., Kula, M.H. (1985) D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. A new enzyme suitable for stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 21: 7–15.
- Iding, H., Siegert, P., Mesch, K., Pohl, M. (1998) Application of α -keto acid decarboxylases in biotransformations. *Biochim Biophys Acta.* 1385: 307–322.
- Imhof, R., Glaettli, H., Bosset, J.O. (1995) Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures. *Lebens Wiss Tech.* 28: 78–86.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 4: 249–264.

- Israelsen, H., Madsen, S.M., Vrang, A., Hansen, E.B., Johansen, E. (1995) Cloning and partial characterization of regulated promoters from *Lactococcus lactis* Tn917-lacZ integrants with the new promoter probe vector, pAK80. *Appl Environ Microbiol.* 61: 2540-2547.
- Jacob, A.E., Hobbs, S.J. (1974) Conjugal Transfer of Plasmid-Borne Multiple Antibiotic Resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol.* 117: 360-372.
- Jiwaji, M., Matcher, G., Gwynneth, F., Dorrington, R.A. (2008) A broad host range reporter plasmid for the analysis of divergent promoter regions. *S Afr J Sci.* 104: 305-307.
- Jollivet, N., Blezenger, M.C., Vayssier, Y., Belin, J.M. (1992) Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. *Appl Microbiol Biot.* 36: 790-794.
- Joseph, P., Ratnayake-Lecamwasam, M., Sonenshein, A.L. (2005). A region of *Bacillus subtilis* Cody protein required for interaction with DNA. *J Bacteriol.* 187: 4127-4139.
- Joshi, V., Jander, G. (2009) Arabidopsis methionine γ -lyase is regulated according to isoleucine biosynthesis needs but plays a subordinate role to threonine deaminase. *Plant Physiol.* 151: 367-378.
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E.R.S., Jeronimus-Stratingh, C.M., Bruins, A.P., Konings, W.N. (1995) The extracellular P_I-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *J Bacteriol.* 177: 3472-3478.
- Kelly, W.J., Ward, L.J.H., Leahy, S.C. (2010) Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biol Evol.* 2: 729-744.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Yvon, M. (2003) Cooperation between *Lactococcus lactis* and non-starter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl Environ Microbiol.* 69: 734-739.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Le-Bars, D., Yvon, M. (2004) The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive

- Lactobacillus INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *Int Dairy J.* 14: 227–235.
- Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G., Yvon, M. (2006) Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol.* 101: 1114-1122.
- Kisumi, M., Komatsubara, S., Chibata, I. (1977) Pathway for isoleucine formation from pyruvate by leucine biosynthetic enzymes in leucine-accumulating isoleucine revertants of *Serratia marcescens*. *J Biochem.* 82: 95-103.
- Kok, J., Buist, G., Zomer, A.L., van Hijum, S.A., Kuipers, O.P. (2005) Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 411–433.
- Köning, S. (1998) Subunit structure, function and organisation of pyruvate decarboxylases from various organisms. *Biochem Biophys Acta.* 1385: 271–286.
- Kovaleva, G.Y., Gelfand, M.S. (2007) Transcriptional regulation of the methionine and cysteine transport and metabolism in streptococci. *FEMS Microbiol Lett.* 276: 207-15.
- Krömer, J.O., Heinzle, E., Schröder, H., Wittmann, C. (2006) Accumulation of homolanthionine and activation of a novel pathway for isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains. *J Bacteriol.* 188: 609-618.
- Kunji, E.R.S., Ubbink, T., Matin, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1993) Physiological responses of *Lactococcus lactis* ML3 to alternating conditions of growth and starvation. *Arch Microbiol.* 159: 372-379.
- Kunji, E.R., Mierau, S., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N. (1996) The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Anton van Lee.* 70: 187-221.
- Lagendijk E.L., Validov, S., Lamers, G.E.M., de Weert, S., Bloemberg, G.V. (2010) Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol Lett.* 305: 81-90.

- Lamarque, M., Charbonnel, P., Aubel, D., Piard, J.C., Atlan, D., Juillard, V., (2004) A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. J Bacteriol. 186: 6492-6500.
- Larrainzar, E., O'Gara, F., Morrissey, J.P. (2005) Applications of autofluorescent proteins for *in situ* studies in microbial ecology. Annu Rev Microbiol. 59: 257-277.
- Larsen, R., Buist, G., Kuipers, O.P., Kok, J. (2004). ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. J Bacteriol. 186: 1147-1157.
- Larsen, R., Kloosterman, T.G., Kok, J., Kuipers, O.P. (2006) GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis*. J Bacteriol. 188: 4978-4982.
- Law, J., Fitzgerald, G.F., Daly, C., Fox, P.F., Farkye, N.Y. (1992) Proteolysis and flavor development in Cheddar cheese made with the single starter strains *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* UC317 or *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP. J Dairy Sci. 75: 1173-1185.
- Law, B.A., Mulholland, F. (1995) Enzymology of lactococci in relation to flavor development from milk proteins. Int Dairy J. 5: 833-854.
- Law, J., Haandrikman, A. (1997) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Int Dairy J. 7: 1-11.
- Law, B.A. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. Int Dairy J. 11: 383-398.
- Lawlor, J.B., Delahunty, C.M., Wilkinson, M.G., Sheehan, J. (2001) Relationships between the sensory characteristics, neutral volatile composition and gross composition of ten cheese varieties. Lait. 81: 487-507.
- Le Gall, T., Darlu, P., Escobar-Páramo, P., Picard, B., Denamur, E. (2005) Selection-driven transcriptome polymorphism in *Escherichia coli/Shigella* species. Genome Res. 15: 260-268.

- Liu, M., Nauta, A., Francke, C., Siezen, R.J. (2008) Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 74: 4590-4600.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 25: 402-408.
- Ludwig, H., Meinken, C., Matin, A., Stülke, J. (2002) Insufficient expression of the *ilv-leu* operon encoding enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis limits growth of a *Bacillus subtilis ccpA* mutant. *J Bacteriol.* 184: 5174–5178.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 15611-15616.
- Malone, C.L., Boles, B.R., Lauderdale, K.J., Thoendel, M., Kavanaugh, J.S, Horswill, A.R. (2009). Fluorescent reporters for *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods.* 77: 251-260.
- Marelli, B., Magni, C. (2010) A simple expression system for *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis*. *World J Microbiol Biotechnol.* 26: 999-1007.
- Margolles, A., Moreno, J.A., Ruiz, L., Marelli, B., Magni, C., de Los Reyes-Gavilán, C.G., Ruas-Madiedo, P. (2010) Production of human growth hormone by *Lactococcus lactis*. *J Biosci Bioeng.* 109: 322-324.
- Marilley, L., Casey, M.G. (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol.* 90: 139-159.

- Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T., Peláez, C. (2006a) Cell membrane damage induced by Lacticin 3147 enhances aldehyde formation in *Lactococcus lactis* IFPL730. *Int J Food Microbiol.* 109: 198-204.
- Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Eagles, J., Gasson, M.J., Requena, T., Hanniffy, S. (2006b) YtjE from *Lactococcus lactis* IL1403 is a C-S lyase with α,γ -elimination activity toward methionine. *Appl Environ Microbiol.* 72: 4878–4884.
- Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T., Peláez, C. (2011) Methionine metabolism: major pathways and enzymes involved and strategies for control and diversification of volatile sulphur compounds in cheese. *Crit Rev Food Sci Nut.* En prensa.
- Marugg, J.D., van Kranenburg, R., Laverman, P., Rutten, G A, de Vos, W.M. (1996). Identical transcriptional control of the divergently transcribed *prtP* and *prtM* genes that are required for proteinase production in *Lactococcus lactis* SK11. *J Bacteriol.* 178: 1525-1531.
- Mauriello, G., Moio, L., Moschetti, G., Piombino, P., Addeo, F., Coppola, S. (2001) Characterization of lactic acid bacteria strains on the basis of neutral volatile compounds produced in whey. *J Appl Microbiol.* 90: 928–942.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait.* 80: 293–324.
- Miller, M.B., Tang, Y.W. (2009) Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 22: 611–633.
- Miller, W.G., Lindow, S.E. (1997). An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions. *Gene.* 191: 149-153.
- Molimard, P., Spinnler, H.E. (1996) Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *J Dairy Sci.* 79: 169–184.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., Sonenshein, A. L. (2003) Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J Bacteriol.* 185: 1911–1922.

- Monticello, D.J., Hadioetomo, R.S., Costilow, R.N. (1984) Isoleucine synthesis by *Clostridium sporogenes* from propionate or alpha-methylbutyrate. J Gen Microbiol. 130: 309-318.
- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P.M. (2003) Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewe's milk cheese Int Dairy J. 13: 201-209.
- Müllder, H. (1952) Taste of flavor forming substances in cheese. Neth Milk Dairy J. 6: 157.
- Nakamura, M.M., Liew, S.Y., Cummings, C.A., Brinig, M.M., Dieterich, C., Relman, D.A. (2006) Growth phase- and nutrient limitation-associated transcript abundance regulation in *Bordetella pertussis*. Infect Immun. 74: 5537-5548.
- Nardi, M., Fiez Vandal, C., Tailliez, P. y Monnet, V. (2002) The EstA esterase is responsible for the main capacity of *Lactococcus lactis* to synthesize short chain fatty acid esters in vitro. J Appl Microbiol. 93: 994-1002.
- Nieto, C., Puyet, A., Espinosa, M. (2001) MalR-mediated regulation of the *Streptococcus pneumoniae* malMP operon at promoter PM. Influence of a proximal divergent promoter region and competition between MalR and RNA polymerase proteins. J Biol Chem. 276: 14946-1954.
- O'Keeffe, R.B., Fox, P.F., Daly, C. (1976) Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. J Dairy Res. 43: 97-107.
- Oku, H., Kaneda, T. (1988) Biosynthesis of Branched-chain Fatty Acids in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem. 264: 18386-18396.
- Otto, R., ten Brink, V., Veldkamp, H., Koenings, W.N. (1983) The relationship between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. FEMS Microbiol Lett. 18: 69-74.
- Parliment, T.H., Kolor, M.G., Rizzo, D.J. (1982). Volatile components of Limburger cheese. J Agr Food Chem. 30: 1006-1008.

- Parry, S.K., Sharma, S.B., Terzaghi, E.A. (1994) Construction of a bidirectional promoter probe vector and its use in analysing *nod* gene expression in *Rhizobium loti*. *Gene*. 150: 105-109.
- Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J., Maury, J. (2010) Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 27: 955-964.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., Piston, D.W. (1997) Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J*. 73: 2782-2790.
- Peláez, C., Requena, T. (2005) Exploiting potentials of bacteria in the cheese ecosystem. *Int Dairy J*. 15: 831-844.
- Pelchat, M., Lapointe, J. (1999) In vivo and in vitro processing of the *Bacillus subtilis* transcript coding for glutamyl-tRNA synthetase, serine acetyltransferase, and cysteinyl-tRNA synthetase. *RNA*. 5: 281-289.
- Petranovic, D., Guédon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D., Renault, P. (2004) Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol Microbiol*. 53: 613–621.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29: 2002-2007.
- Pfaffl, M.W. (2004) Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: *A-Z of Quantitative PCR* S.A.Bustin, editor. International University Line. USA, p. 87-120.
- Phillips, A.T., Nuss, J.I., Moosic, J., Foshay, C. (1972) Alternate pathway for isoleucine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 109: 714-719.
- Poolman, B., Konings, W.N. (1988) Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. *J Bacteriol*. 170: 700-707.
- Poolman, B., Kunji, E.R.S., Hagting, A., Juillard, V., Koning, W.N. (1995) The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol Symp Suppl*. 79: 65-75.

- Rademaker, J.L., Herbet, H., Starrenburg, M.J., Naser, S.M., Gevers, D., Kelly, W.J., Hugenholtz, J., Swings, J., van Hylckama Vlieg, J.E. (2007) Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)₅-PCR fingerprinting. *Appl Environ Microbiol.* 73: 7128–7137.
- Raya, R., Bardowski, J., Andersen, P.S., Ehrlich, S.D., Chopin, A. (1998) Multiple transcriptional control of the *Lactococcus lactis trp* operon. *J Bacteriol.* 180: 3174–3180.
- Reiter, B., Fryer, T.F., Pickering, A., Chapman, H.R., Lawrence, R.C., Sharpe, M.E. (1967) The effect of the microbial flora on the flavour and free fatty acid composition of cheddar cheese. *J Dairy Res.* 34: 257-272.
- Reitzer, L.J. (1996) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In: Neidhardt FC (Ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, 2nd Edn., Vol. 1 (pp 391–407). ASM Press, Washington, DC.
- Requena, T., Peláez, C. (2007). Influencia en el aroma de queso del catabolismo de aminoácidos por *Lactococcus lactis*. *SEM.* 44: 18-23.
- Rijnen, L., Bonneau, S., Yvon, M. (1999a) Genetic characterization of the major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4873–4880.
- Rijnen, L., Delacroix-Buchet, A., Demaizieres, D., Le Quere, J.L., Gripon, J.C. and Yvon, M. (1999b) Inactivation of lactococcal aromatic aminotransferase prevents the formation of floral aroma compounds from aromatic amino acids in semi-hard cheese. *Int Dairy J.* 9: 877-885.
- Rijnen, L., Yvon, M., van Kranenburg, R., Courtin, P., Verheul, A., Chambellon, E., Smit, G. (2003) Lactococcal aminotransferases AraT and BcaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese. *Int Dairy J.* 13: 805–812.

- Risso, C., Van Dien, S.J., Orloff, A., Lovley, D.R., Coppi, M.V. (2008) Elucidation of an alternate isoleucine biosynthesis pathway in *Geobacter sulfurreducens*. J Bacteriol. 190: 2266-2274.
- Rizzi, G.P. (1998) The Strecker degradation and its contribution to food flavor. In Teranishi, R., Wick, E.L., Hornstein, I. (eds): Flavor chemistry: 30 years of progress. Springer. pp: 335-445.
- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., Gelfand, M.S. (2004) Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. Nucleic Acids Res. 32: 3340-53.
- Rottiers, P., De Smedt, T., Steidler, L. (2009) Modulation of Gut-Associated Lymphoid Tissue Functions with Genetically Modified *Lactococcus lactis*. Int Rev Immunol. 28: 465-486.
- Roudot-Algaron, F., Yvon, M. (1998) Aromatic and branched chain amino acids catabolism in *Lactococcus lactis*. Lait. 78:23–30.
- Rychlik, M., Bosset, J.O. (2001) Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Evaluation of potent odorants. International Dairy Journal. 11: 895–901.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanz, Y., Lanfermeijer, F.C., Renault, P., Bolotin, A., Konings, W.N., Poolman, B. (2001) Genetic and functional characterization of *dpp* genes encoding a dipeptide transport system in *Lactococcus lactis*. Arch Microbiol. 175: 334–343
- Sava, I.G., Heikens, E., Huebner, J. (2010) Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clin Microbiol Infect. 16: 533-540.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 71: 394–406.

- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Baelz, R., Collins, M.D., Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst Appl Microbiol. 6: 183–195.
- Schütte, H., Hummel, W., Kula, M.H. (1984) L-2-Hydroxyisocaproate dehydrogenase-a new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. Appl Microbiol Biotechnol. 19: 167–176.
- Seefeldt, K., Weimer, B.C. (2000) Diversity of sulphur compounds in lactic acid bacteria. J Dairy. Sci. 83: 2740-2746.
- Serror, P., Sonenshein, A.L. (1996) Interaction of CodY, a novel *Bacillus subtilis* DNA-binding protein, with the dpp promoter region. Mol Microbiol. 20: 843-52.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. Nat Biotechnol. 22: 1567-1572.
- Sheldon, R.M., Lindsay, R.C., Libbey, L.M., Morgan, ME. (1971) Chemical nature of malty flavor and aroma produced by *Streptococcus lactis* var. maltigenes. Appl Microbiol. 22: 263-266.
- Shivers, R.P., Sonenshein, A.L. (2004) Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. Mol Microbiol. 53:599–611.
- Shivers, R.P., Sonenshein, A.L. (2005) *Bacillus subtilis* *ilvB* operon: an intersection of global regulons. Mol Microbiol. 56: 1549-1559.
- Siezen, R.J. (1999) Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. Anton van Lee. 76:139–155
- Siezen, R.J., Kok, J., Abee, T., Schaafsma, G. (2002) Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. Anton van Lee. 82: 1-4.

- Siezen, R.J., Bayjanov, J., Renckens, B., Wels, M., van Hijum, S.A., Molenaar, D., van Hylckama Vlieg, J.E. (2010) Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147, a plant-associated lactic acid bacterium. *J Bacteriol.* 192: 2649-2650.
- Slack, F.J., Serror, P., Joyce, E., Sonenshein, A.L. (1995) A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *Mol Microbiol.* 15: 689-702.
- Smit, G., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Engels, W.J.M. (2002) Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacteria. *Aust J Dairy Technol.* 57: 61– 68.
- Smit, B.A., Engels, W.J.M., Bruinsma, J., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2004a) Development of a high throughput-screening method to test flavour-forming capability of anaerobic microorganisms. *J Appl Microbiol.* 97: 306– 313.
- Smit, B.A., Engels, W.J.M., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2004b) Diversity of L-leucine catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentations and identification of the rate controlling step in 3-methylbutanal formation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 396–402.
- Smit, B.A., Engels, W.J., Alewijn, M., Lommerse, G.T., Kippersluijs, E.A., Wouters, J.T., Smit, G. (2004c) Chemical conversion of α -keto acids in relation to flavor formation in fermented foods. *J Agric Food Chem.* 52: 1263-1268.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. (2005a) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 591– 610.
- Smit, B.A., Vlieg, J.E.T.V., Engels, W.J.M., Meijer, L., Wouters, J.T.M., Smit, G. (2005b) Identification, cloning, and characterization of a *Lactococcus lactis* branched-chain alpha-keto acid decarboxylase involved in flavor formation. *Appl Environ Microbiol.* 71: 303–311.

- Smit, B.A., Engels, W.J.M., Smit, G. (2009) Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *App Microbiol Biotechnol.* 81: 987-999.
- Smith, E.L., Austen, B.M., Bluementhal, K.M., Nyk, J.F. (1975). Glutamate dehydrogenases. In: P.D. Boyer, ed. *The enzymes*, pp. 293-367, New York: Academic Press.
- Soda, K. (1987) Microbial sulfur amino acids: an overview. *Methods Enzymol.* 143: 453-459.
- Sonenshein, A.L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 8: 203-207.
- Sonenshein, A.L. (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol.* 5: 917–927.
- Sperandio, B., Polard, P., Ehrlich, D. S., Renault, P., Guédon, E. (2005) Sulfur amino acid metabolism and its control in *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* 187: 3762–3778.
- Sperandio, B., Gautier, C., McGovern, S., Ehrlich, D.S., Renault, P., Martin-Verstraete, I., Guédon, E. (2007) Control of methionine synthesis and uptake by MetR and homocysteine in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 189: 7032-7044.
- Stuart, M.R., Chou, L.S., Weimer, B.C. (1999) Influence of carbohydrate starvation and arginine on culturability and amino acid utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 65: 665–673.
- Tailliez, P., Tremblay, J., Ehrlich, S.D, Chopin, A. (1998) Molecular diversity and relationship within *Lactococcus lactis*, as revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Syst Appl Microbiol.* 21: 530–538.
- Tam le, T., Eymann, C., Antelmann, H., Albrecht, D., Hecker, M. (2007) Global gene expression profiling of *Bacillus subtilis* in response to ammonium and tryptophan starvation as revealed by transcriptome and proteome analysis. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 12: 121-130.

- Tammam, J.D., Williams, A.G., Noble, J., Lloyd, D. (2000) Amino acid fermentation in non-starter *Lactobacillus* spp. Isolated from cheddar cheese. Lett Appl Microbiol. 30: 370-374.
- Tan-a-Ram, P., Cardoso, T., Daveran-Mingot, M.L., Kanchanatawee, S., Loubière, P., Girbal, L., Coccagn-Bousquet, M. (2011) Assessment of the diversity of dairy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates by an integrated approach combining phenotypic, genomic, and transcriptomic analyses. Appl Environ Microbiol. 77: 739-48.
- Tanous, C., Kieronczyk, A., Helinck, S., Chambellon, E., Yvon, M. (2002) Glutamate dehydrogenase activity: A major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. Ant van Lee. 82: 271–278.
- Tanous, C., Gori, A., Rijnen, L., Chambellon, E., Yvon, M. (2005a) Pathways for alpha-ketoglutarate formation by *Lactococcus lactis* and their role in amino acid catabolism. Int Dairy J. 15:759–770.
- Tanous, C., Chambellon, E., Sepulchre, A.M., Yvon, M. (2005b) The gene encoding the glutamate dehydrogenase in *Lactococcus lactis* is part of a remnant Tn3 transposon carried by a large plasmid. J Bacteriol. 187: 5019–5022.
- Tanous, C., Chambellon, E., Yvon, M. (2007). Sequence analysis of the mobilizable lactococcal plasmid pGdh442 encoding glutamate dehydrogenase activity. Microbiology. 153: 1664-1675.
- Tavaria, F.K., S. Dahl, F.J. Carballo, y F.X. Malcata. (2002). Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. J Dairy Sci. 85: 2462–2470.
- Tecon R., Binggeli, O., Van Der Meer, J.R. (2009) Double-tagged fluorescent bacterial bioreporter for the study of polycyclic aromatic hydrocarbon diffusion and bioavailability. Environ Microbiol. 11: 2271–2283.
- Thierry, A., Maillard, M.B., Yvon, M. (2002) Conversion of L-leucine to isovaleric acid by *Propionibacterium freudenreichii* TL 34 and ITGP23. Appl Environ Microbiol. 68: 608–615.

- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., Fujita, Y. (2005) Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol Microbiol.* 56: 1560–1573.
- Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H.T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., Conway, T. (2008) The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 68: 1128-1148.
- Tucker, B.J., Breaker, R.R. (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. *Curr Opin Struct Biol.* 15: 342-348.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 5116–5121.
- Urbach, G. (1993) Contribution of lactic acid bacteria to flavor compound formation in dairy products. *Int Dairy J.* 5: 877-903.
- van Hylckama Vlieg, J.E, Rademaker, J.L, Bachmann, H., Molenaar, D., Kelly, W.J., Siezen, R.J. (2006). Exploiting natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis* for innovations in food fermentations. *Curr Opin Biotechnol.* 17: 183–190.
- van Hylckama Vlieg, J.E.T., Hugenholtz, J. (2007) Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavor and health benefits. *Int Dairy J.* 17: 1290-1297.
- Varmanen, P., Ingmer, H., Vogensen, F.K. (2000) *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology.* 146: 1447–1455.
- Vido, K., Le Bars, D., Mistou, M.Y., Anglade, P., Gruss, A., Gaudu, P. (2004) Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system. *J Bacteriol.* 186: 1648–1657.
- Vijayendran, C., Polen, T., Wendisch, V.F., Friehs, K., Niehaus, K., Flaschel, E. (2007) The plasticity of global proteome and genome expression analyzed in closely related W3110 and MG1655 strains of a well-studied model organism, *Escherichia coli*-K12. *J Biotechnol.* 128: 747-61.

- Villapakkam, A.C., Handke, L.D., Belitsky, B.R., Levnikov, V.M., Wilkinson, A.J., Sonenshein, A.L. (2009) Genetic and biochemical analysis of the interaction of *Bacillus subtilis* CodY with branched-chain amino acids. *J Bacteriol.* 191: 6865-6876.
- Visser, S. (1993) Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J Dairy Sci.* 76: 329-350.
- Warner, J.B., Lolkema, J.S. (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 475–490.
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M.J., Kuipers, O. P., van Sinderen, D., Kok, J. (2007) Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol.* 189: 3256-3270.
- Weimer, B.C., Seefeldt, K., Dias, B. (1999) Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 247-261.
- Wels, M., Groot Kormelink, T., Kleerebezem, M., Siezen, R.J., Francke, C. (2008) An in silico analysis of T-box regulated genes and T-box evolution in prokaryotes, with emphasis on prediction of substrate specificity of transporters. *BMC Genomics.* 9: 330-346.
- Wiedenmann, J., Oswald, F., Nienhaus, G.U. (2009) Fluorescent proteins for live cell imaging: Opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life.* 61: 1029-1042.
- Wood, K.V. (1995) Marker proteins for gene expression. *Curr Opin Biotechnol.* 6: 50-58.
- Xu, H., Zhang, Y., Guo, X., Ren, S., Staempfli, A.A., Chiao, J., Jiang, W., Zhao, G. (2004) Isoleucine biosynthesis in *Leptospira interrogans* serotype lai strain 56601 proceeds via a threonine independent pathway. *J Bacteriol.* 186: 5400-5409.
- Yvon, M., Thirouin, R., Rijnen, L., Fromentier, D., Gripon, J.C. (1997) An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavour compounds. *Appl Environ Microbiol.* 63: 414–419.

- Yvon, M., Berthelot, S. and Gripon, J. C. (1998) Adding α -ketoglutarate to semi-hard cheese curd highly enhances the conversion of amino acids to aroma compounds. *Int Dairy J.* 8: 889-898.
- Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A., Roudot-Algaron, F. (2000) Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763. *Appl Environ Microbiol.* 66: 571–577.
- Yvon, M., Rijnen, L. (2001) Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int Dairy J.* 11: 185–201.
- Yvon, M. (2006) Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Aust J Dairy Technol.* 61: 88-96.
- Yvon, M., Gitton, C., Chambellon, E., Bergot, G., Monnet, V. (2010) The initial efficiency of the proteolytic system of *Lactococcus lactis* strains determines their responses to a cheese environment. *Int Dairy J.* 21: 335-345.
- Zhang, C., Gai, Y., Zhu, Y., Chen, X., Jiang, X. (2008) Construction of a bidirectional promoter and its transient expression in *Populus tomentosa*. *Front For China.* 3: 112-116.
- Zomer, A.L., Buist, G., Larsen, R., Kok, J., Kuipers, O.P. (2007) Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol.* 189: 1366-1381.